

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



# **Využití rostlin při přípravě vakcín proti lidskému papillomaviru**

**The Use of Plants for the Expression of Human Papillomavirus Vaccines**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Lucie Dlabalová**

Školitel: Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D.

Katedra experimentální biologie rostlin

Praha 2011

## **Poděkování**

*Chtěla bych moc poděkovat svému školiteli*

*Mgr. Tomáši Moravci, Ph.D. za odbornou pomoc a cenné rady  
v průběhu vytváření této práce a také za trpělivost a přátelský přístup.*

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně na základě studia citované literatury a za pomoci konzultací se svým školitelem.

V Praze dne 9. května 2011

.....

Lucie Dlabalová

# OBSAH

Abstrakt a klíčová slova	3
Seznam použitých zkratk	4
<b>1 Úvod</b>	<b>5</b>
<b>2 Lidský papillomavirus (Human Papillomavirus, HPV)</b>	<b>6</b>
2.1. Epidemiologie a onemocnění vyvolaná HPV . . . . .	6
2.2. Charakteristika a přenos HPV . . . . .	7
2.3. Identifikace, diagnostika, klinické postupy . . . . .	10
<b>3 HPV vakcíny</b>	<b>11</b>
3.1. Současné profylaktické (preventivní) vakcíny . . . . .	11
3.2. Terapeutické vakcíny . . . . .	12
3.3. Budoucí generace vakcín proti HPV – „druhá generace“. . . . .	14
<b>4 Rostlinné expresní systémy, jejich výhody a nevýhody</b>	<b>15</b>
<b>5 Způsoby modifikací rostlin</b>	<b>17</b>
5.1. Stabilní jaderná transformace . . . . .	17
5.2. Stabilní chloroplastová transformace . . . . .	19
5.3. Transientní (přechodná) transformace . . . . .	20
<b>6 Optimalizace rostlinných expresních systémů</b>	<b>26</b>
<b>7 Které rostlinné druhy by byly potencionálně nejefektivnější?</b>	<b>27</b>
<b>8 Současný vývoj a budoucnost rostlinných expresních systémů</b>	<b>30</b>
<b>9 Závěr</b>	<b>31</b>
<b>Použitá literatura</b>	<b>32</b>

## ABSTRAKT

Papillomaviry způsobují různá onemocnění od kožních bradavic až po léze vedoucí ke vzniku maligních nádorů. Mezi lidmi jsou velice rozšířeny. Proto se v současnosti vyvíjí metody produkce levných a účinných vakcín jak pro jejich prevenci tak i terapii nádorů. V současnosti jsou k produkci farmaceutik nejčastěji používány živočišné a mikrobiální expresní systémy, které mají mnoho nevýhod a v budoucnu nemohou pokrýt poptávku. Otevírá se tak možnost využití rostlin jako potenciálně velmi efektivních producentů léčiv. Rostlinné expresní systémy se optimalizují a dochází ke zvyšování výtěžků, intenzivně se hledají cesty jejich nejlepšího a nejbezpečnějšího způsobu využití.

Tato práce shrnuje a porovnává výhody a nevýhody různých způsobů transformací rostlin, vedoucí buď ke stabilní produkci požadovaného proteinu v transgenních rostlinách, nebo přechodné expresi prostřednictvím rekombinantního rostlinného viru infikujícího netransgenní rostliny. Dále hledá nejvhodnější rostlinné druhy, poskytující vysoké výtěžky ve spojení s určitou transformační metodou a umožňující snadný způsob pěstování, popisuje několik základních způsobů optimalizací exprese a nastiňuje budoucnost rostlinných expresních systémů.

**Klíčová slova:** Papillomaviry, HPV vakcíny, VLP, rostlinné viry, rostlinné expresní systémy, transientní exprese, transformace rostlin, virové vektory

## ABSTRACT

Papillomaviruses are causing various diseases from skin warts to the lesions leading to malignant tumours and are widespread among people. For this reason, the current research is trying to develop methods for the production of inexpensive and effective vaccines against both Papillomaviruses and against all other infectious diseases. Currently animal and microbial expression systems are most frequently used for the production of biopharmaceuticals which have several drawbacks and their capacity is limited. This opens up the doors for plants - potentially very efficient producers of biopharmaceuticals. Currently there is rapid development towards the optimization and improvement of the results of plant expression systems and establishing the best and safest methods of their use.

This paper summarizes and compares the advantages and disadvantages of different methods of plant transformation, leading either to stable production of the protein of interest in transgenic plants or to transient expression of recombinant virus infecting non-transgenic plants. Furthermore it analyzes the most appropriate plant species, which provide high yields combined with a transformation method and ease of cultivation, describes few basic ways of optimizing expression levels and outlines the future of plant expression systems.

**Key words:** Papillomaviruses, HPV vaccines, VLP, plant virus, plant expression systems, transient expression, plant transformation, viral vectors

## Seznam použitých zkratek

AIMV	Alfalfa Mosaic Virus, virus mozaiky vojtěšky
APC	antigen-presenting cell
BM	bazální membrána
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus, virus mozaiky kvěťáku
CIN	cervical intraepithelial neoplasia, intraepiteliální neoplázie děložního hrdla
CKI	cyklin-dependent kinase inhibitor
CP	coat protein, kapsidový protein viru
dsDNA	double strand (dvouvláknová) DNA
GALT	gut-associated lymphoid tissue, lymfoidní tkáň asociovaná se střevem
GMO	genetic modified organism, geneticky modifikované organismy
GMP	Good Manufacturing Practice
GSK	firma GlaxoSmithKline
HBV	Hepatitis B virus, virus žloutenky typu B
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPV	Human Papillomavirus, lidský papillomavirus
HSPG, HS	proteoglykan heparan sulfát
IARC	International Agency for Research on Cancer, Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
LCR	long control region – nekódující regulační oblast genomu papillomavirů
ori	replication origin, počátek replikace
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVs	papillomaviry
PVX	Potato Virus X, bramborový virus X
ssRNA	single strand (jednovláknová) RNA
TMV	Tabacco Mosaic Virus, virus tabákové mozaiky
TSP	total soluble protein, podíl proteinu (v %) z celkového rozpustného proteinu
VLP	virus-like particles, neinfekční virové částice

# 1 Úvod

Lidský papillomavirus patří do čeledi *Papillomaviridae*, která je tvořena malými neobalenými dsDNA viry. Existuje asi 200 genotypů (sérotypů) HPV, z nichž zhruba 40 infikuje lidskou anogenitální oblast převážně žen, ale i mužů. HPV patří mezi nejčastěji sexuálně přenosné choroby na světě. Každoročně je příčinou téměř půl milionu nových případů karcinomu děložního čípku a přes 270 tisíc úmrtí na toto onemocnění, z čehož přes 80% připadá na země třetího světa z důvodu téměř nulových preventivních vyšetření a celkově nedostačující zdravotní péče. Stává se tak původcem druhé nejčastější rakoviny u žen (Sankaranarayanan and Ferlay 2006). Předpokládá se, že kdyby došlo ke globální aplikaci vakcín proti HPV, kleslo by riziko rakoviny u žen minimálně o 15 % a každoročně by bylo zachráněno více než 200 000 životů (rev. zur Hausen 2002).

Současné profylaktické vakcíny mají bohužel několik nevýhod: jsou drahé, nechrání vůči všem typům HPV, musí se skladovat v chladu a podávají se prostřednictvím intramuskulárních injekcí, což bývá bolestivé a navíc to může být v chudších oblastech potencionální zdroj šíření dalších infekčních agens, jako například HBV nebo HIV. Proto se momentální vývoj ubírá směrem k levným, termostabilním vakcínám, poskytujícím dlouhodobou ochranu organismu (desetiletí) proti všem typům HPV, minimálně se stejnou účinností jako vakcíny současné a podávané nejlépe orálně. Doufejme, že se podaří vyvinout i terapeutické vakcíny, které by byly schopny léčit již rozvinuté onemocnění.

Zde se otevírá prostor pro využití rostlin, zejména v oblasti levných orálně podávaných vakcín, které by měly asi nejsnadnější a nejrychlejší aplikaci v zemích třetího světa. Zvýšila by se tak dostupnost očkování i pro ty nejchudší a snížil by se počet obětí karcinotvorných typů HPV. Vyspělé země se ale také snaží zaměřovat vývoj spíše na léčiva s neinvazivním způsobem aplikace - pro každého pacienta je totiž daleko příjemnější přijímat očkování či jiné léky prostřednictvím prášků či kapslí namísto bolestivých injekcí.

## 2 Lidský papillomavirus (Human Papillomavirus, HPV)

### 2.1. Epidemiologie a onemocnění vyvolaná HPV

Z dat (výzkum IARC – Internacional Agency for Research on Cancer, 2002) uvedených v úvodu vyplývá, že rakovinná onemocnění způsobená HPV nabývají pandemického charakteru. V dnešní době se již minimálně 50 % všech sexuálně aktivních žen a mužů během svého života setkalo s tímto virem (<http://www.cdc.gov/hpv/>). Bohužel, i přes preventivní očkování a vyšetření, každoročně narůstá pacientů s karcinomy vyvolanými HPV a to i ve vyspělých zemích (Sankaranarayanan and Ferlay 2006).

Virus HPV se přenáší přímým stykem epitelů, nejčastěji při pohlavním styku. Vyšší počet sexuálních partnerů koreluje s větší pravděpodobností nákazy a použití kondomu během styku nemá efekt na zabránění HPV infekce, jelikož externí oblasti genitálu jsou stále odhaleny (Vaccarella et al. 2006). V boji proti infekci má velký význam stav imunitního systému jedince. Je známa větší incidence perzistentních infekcí a vývoje HPV karcinomů u imunosuprimovaných jedinců (Petry et al. 1994). Některé ženy mohou mít dokonce genetické predispozice a větší náchylnost k onemocněním spojeným s HPV (Magnusson, Sparen and Gyllensten 1999).

Nízkorizikové typy HPV mohou způsobovat kožní bradavice (*verrucae*), bradavice anogenitální oblasti (*Condyloma acuminata*, nejčastěji způsobené HPV6 a 11), *Laryngeal papillomatosis*<sup>1</sup> a benigní nádory. Vysoce rizikové typy HPV způsobují intraepiteliální neoplasii<sup>2</sup> děložního hrdla, pochvy, penisu a řitního otvoru, což může vést k rozvoji invazivních maligních nádorů. Mezi tyto vysoce rizikové perzistentní typy patří zejména HPV16 a 18, dále HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 66 (shrnutí v Cutts et al. 2007).

V roce 2008 získal německý virolog Harald zur Hausen Nobelovu cenu v oblasti medicíny a fyziologie za objev původce rakoviny děložního čípku - HPV. Se svým týmem studoval a poprvé izoloval různé typy HPV zejména na přelomu 70. a 80. let 20. století ([nobelprize.org](http://nobelprize.org)).

---

<sup>1</sup>*Laryngeal papillomatosis* = recidivující respirační papillomatóza – vzácné onemocnění, při kterém vznikají v hrdle (*larynx*) a respiračním ústrojí benigní tumory či papily, které mohou v krajních případech bránit dýchání.

<sup>2</sup> Intraepiteliální neoplasie – premaligní transformace a abnormální růst (dysplasie) buněk, též nazývané prekarcenózní léze; intraepiteliální neoplasie děložního čípku = cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

## 2.2. Charakteristika a přenos HPV

Virové kapsidy papillomavirů o velikosti 50-55 nm, jsou složeny ze 72 kapsomer - pentamerů L1 proteinu. Pod kapsomerami se nachází minoritní L2 proteiny vázající DNA, která spolu s histony tvoří jakýsi „minichromosom“. Symetrie kapsidy je ikosaedrální (Streeck 2002).

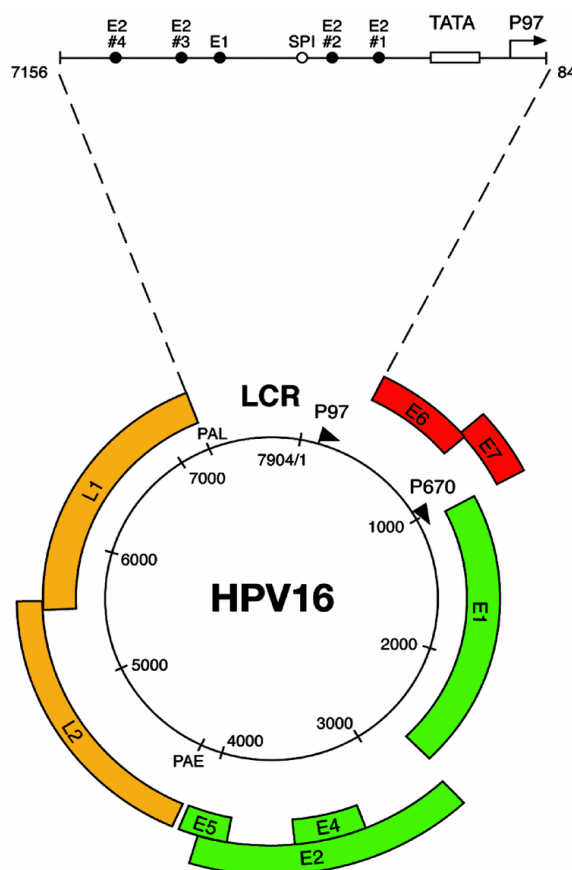
Velikost cirkulárního genomu je přibližně 6,8 - 8 kbp. Genom obsahuje nestrukturní regulační proteiny E1, E2, E3, E4, E5, E6 a E7 (early genes) a strukturní L1 a L2 (late genes). Jako první jsou exprimovány E1 a E2 proteiny, které mají navodit provirový stav v buňce a regulovat expresi virových genů. V bazálních vrstvách epitelu je exprese onkogenů E6 a E7 brzděna kratší formou E2 (transkripční represor), díky čemuž není vyprovokována dostatečná protinádorová imunitní odpověď a virus je schopen se zpočátku „skrývat“. Při normální infekci je virová DNA transkribována jako episom (plasmid) v jádře buňky, kde využívá hostitelský transkripční aparát. V některých případech infekcí vysoce rizikovými typy HPV se může stát, že dojde k integraci do hostitelského genomu. Cirkulární genom se při integraci nejčastěji otevírá ve čtecím rámci E2 genu, který je tím narušen. Onkogeny E6 a E7 jsou poté nekontrolovatelně exprimovány a podporují maligní bujení. Pokročilejší stadia CIN a karcinomy unikají imunitnímu systému deregulací antigen-prezentujícího systému buněk. Nádory se tedy mohou pomalu rozvíjet (shrnutí v zur Hausen 2002, Woodman, Collins and Young 2007, Spataro, Norbury and Harris 1998).

Obrázek 1.: Organizace genomu HPV16.

Znázorněna organizace genomu: čtecí rámce genů L1, L2 a E1 – E7, časný (p97) a pozdní (p670) promotory, LCR (long control region) – nekódující oblast obsahující regulační místa pro replikaci a transkripci; znázorněna místa pro vazbu E2 proteinu (nepřímý regulátor fixující E1 helikázu v ori) a TATA element p97 promotoru.

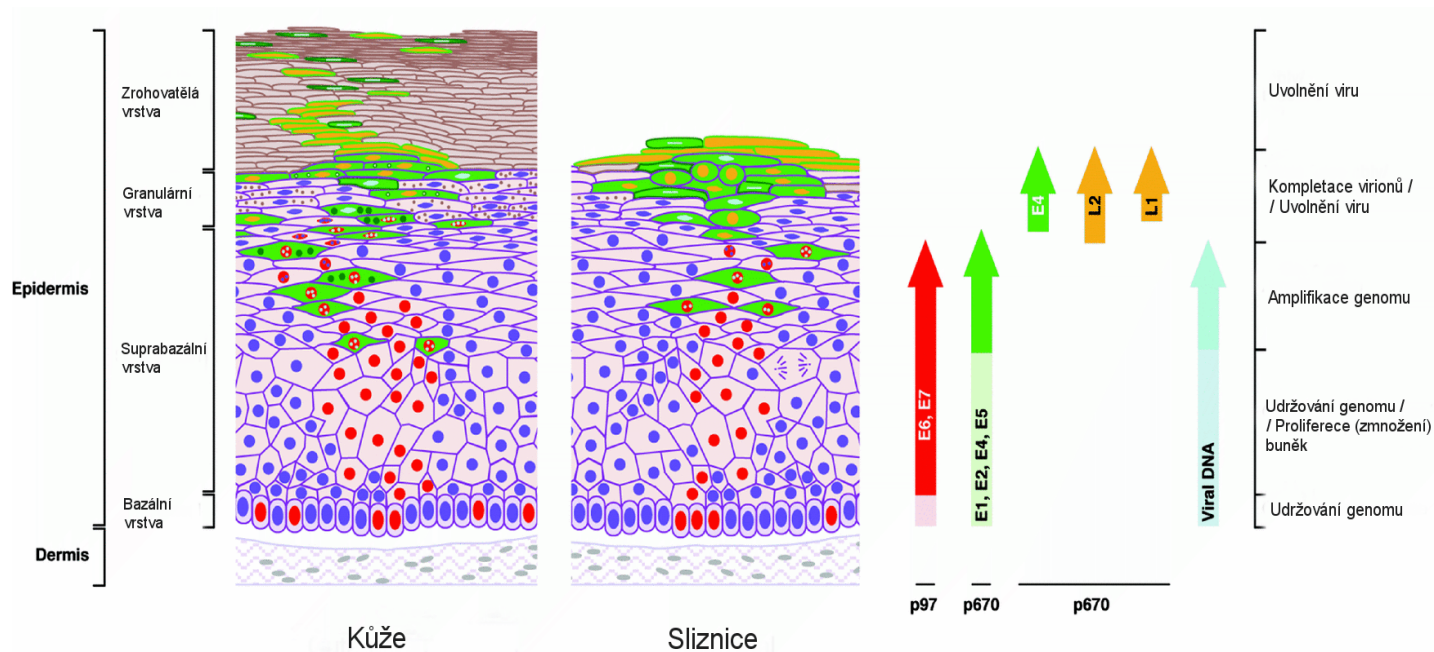
Pozn.: Všechny virové geny jsou kódovány na jednom vlákně dsDNA genomu.

(převzato z rev. Doorbar 2006)





Papillomaviry (PVs) se od ostatních virů liší tím, že pro dokončení svého „životního“ cyklu jsou omezeny na vrstevnatý epitel, v kterém dochází k postupné diferenciaci buněk bazálního epitelu v keratinocyty (z tohoto důvodu je velmi obtížné poskytnout viru v buněčné kultuře podmínky k vytvoření infekčních virionů - dokáže to jen několik specializovaných laboratoří na světě). PVs jsou schopny se vázat pouze na bazální membrány (BM) kožního nebo slizničního epitelu, které se odhalují při chemickém či mechanickém poškození, ke kterému dochází například při pohlavním styku (shrnutí v Schiller, Day and Kines 2010).



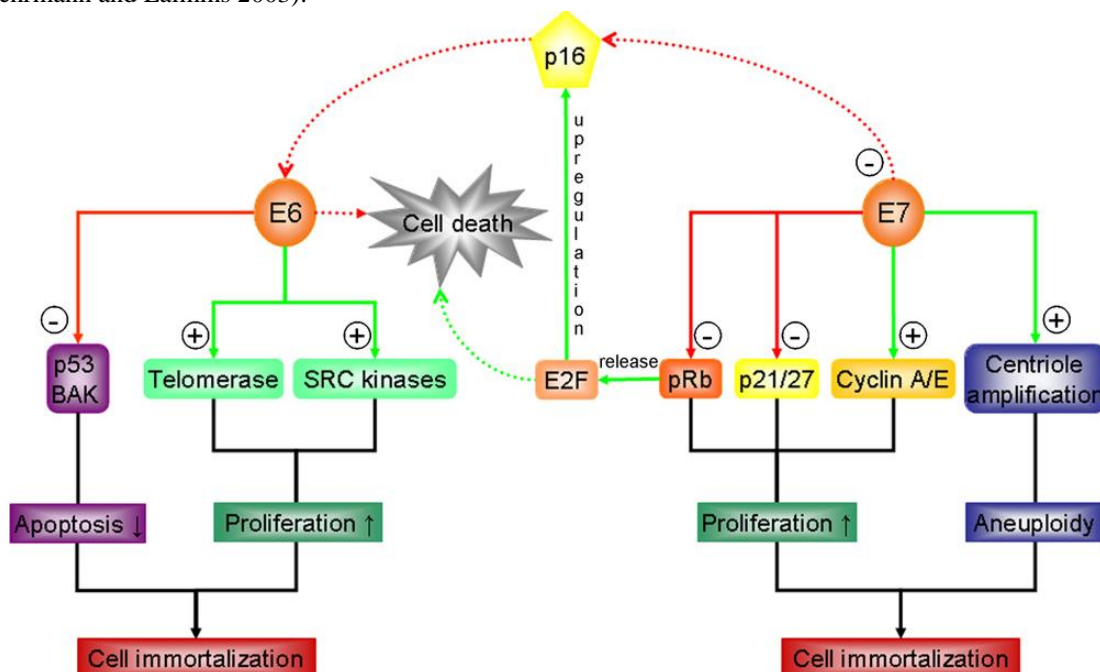
Obrázek 2.: **Expres virových genů podle rozdílných stádií diferenciace epiteliálních buněk** (upraveno podle rev. Doorbar 2006).

Tumor supresorový p53<sup>3</sup> a retinoblastomový protein pRb<sup>4</sup> regulují buněčný cyklus a v případě poškození DNA vedou buňku k apoptóze. E6 se v asociaci s ubiquitin ligázou E6-AP (E6-association protein) váže na p53, čímž jej častěji směřuje k degradaci v proteasomu. E6 navíc dalšími mechanismy brání apoptóze a stimuluje buněčné dělení. E7 podobným způsobem deaktivuje pRb inhibující transkripční faktor E2F, tudíž i buněčný cyklus. E7 podporuje dělení a růst buněk stimulací genů S-fáze (cyklin A a cyklin E) a blokáci inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CKI) p21 a p27, dále způsobuje aneuploidii buňky, což přispívá k tumorogenezi. U vysoce rizikových typů HPV tak tyto dva virové proteiny nezávisle

<sup>3</sup> p53 je velice nestabilní DNA-vazebný protein, který se v normální buňce rozpadne za cca 20 - 35 min. Pokud dojde ke stresu či poškození DNA, p53 je stabilizován a vede buňku k apoptóze. p53 reguluje buněčný cyklus.

<sup>4</sup> pRb je v normálních buňkách za časně G1 fáze buněčného cyklu hypofosforylován, váže se na transkripční faktor E2F a brání transkripci. Po stimulaci je pRb fosforylován, uvolní E2F a buňka může vstoupit do S fáze.

interferují se dvěma hlavními kontrolními body buněčného cyklu a způsobují imortalizaci a transformaci buněk. Plně diferencované keratinocyty ve svrchních vrstvách epitelu, které se za normálních okolností nemohou dělit, se po této transformaci dělí. Může tak v nich docházet k replikaci virového genomu, expresi L1 a L2 genů, kompletaci infekčních virových částic a jejich uvolňování z odlupujících se keratinocytů. HPV tedy má lytický i lyzogenní cyklus, lytický se ale projevuje až v keratinocytech (shrnutí v zur Hausen 2002, Boulet et al. 2007, Fehrman and Laimins 2003).



Obrázek 3.: Souhrnné schéma hlavních buněčných interakcí E6 a E7 onkoproteinů a jejich koordinace drah vedoucích k imortalizaci buňky (převzato z rev. Boulet et al. 2007).

L1 kapsidový protein je rozhodující pro iniciaci vazby na povrch bazálních membrán (BM). Obsahuje vazebné místo pro proteoglykan heparan sulfát (HSPG, HS) v BM (HSPGs na buňkách epitelu neobsahují glykosylační vzory, které by L1 vázal) (Giroglou et al. 2001, Kines et al. 2009). Po vazbě na HS dojde ke konformační změně L1 a odkrytí doposud skrytého N-konce L2, který pak může být štěpen furinem (proprotein konvertáza), což je nezbytný krok infekitivity. Na L2 se tak vytvoří epitop pro interakce s imunitním systémem a na L1 se odhalí místo pro vazbu se zatím neidentifikovaným sekundárním receptorem na epitelální buňce (Richards et al. 2006). Keratinocyty putující BM do míst poranění mohou být infikovány přímo. Tento postup je však kontraproduktivní, jelikož často způsobuje rychlejší a silnější imunitní odpověď (shrnutí v Schiller et al. 2010).

Po internalizaci virionů pomocí endocytózy (trvající 2 - 4 h) je HPV schopen intracelulárního transportu (Culp and Christensen 2004). Po 8 - 12 h jsou kapsidy zbavené L1 pentamerů schopny

opustit pozdní endozom a pravděpodobně pomocí mikrotubulů putovat k jádru, do kterého se nejsnadněji dostanou během mitózy, méně často přes karyopheriny. Pro penetraci endosomální membrány a vazbu na molekulární motor dynein je nutný L2 protein kapsidy (Kamper et al. 2006, Florin et al. 2006). V jádře virový genom interaguje s ND10 tělísky, čímž započne jeho transkripce (12 - 24h po vazbě virionu na buňku) (Everett 2001).

### **2.3. Identifikace, diagnostika, klinické postupy**

Při infekci vysoce rizikovou perzistentní formou HPV je rozvoj infekce zpočátku asymptomatický. U 5 – 10 % žen se někdy až po 20ti letech vyvine CIN vedoucí k invazivním nádorům. Onemocnění se poprvé projevuje nejčastěji u žen mezi 30. – 50. rokem života. Každá žena by proto měla pravidelně podstupovat preventivní vyšetření, kdy se na základě kolposkopie a biopsie tkáně provedou histologická vyšetření detekující dysplazii buněk – tzv. Papanicolaou (Pap) test. Pokud je nález pozitivní, je už většinou nutný chirurgický zákrok, který je často příčinou ztráty plodnosti. Další testy se zaměřují na identifikaci proteinů E6 a E7 nebo HPV DNA pomocí hybridizace a PCR – velice spolehlivé metody detekce, bohužel však drahé. Neustále se tedy hledají markery HPV a jeho interakce s hostitelem, což by mělo směřovat k vývoji jednoduchých, spolehlivých a hlavně levných testů a vakcín, kterých by byly potřeba zejména v chudých oblastech (shrnuje Cutts et al. 2007, zur Hausen 2002).

## 3 HPV vakcíny

### 3.1. Současné profylaktické (preventivní) vakcíny

V současnosti jsou v klinické praxi 2 vakcíny, obě většinou dobře snášené. Kvadrivalentní (HPV6, 11, 16 a 18) Gardasil, u nás dostupný pod názvem Silgard, od americké firmy Merck & Co. a původně bivalentní (16 a 18) Cervarix<sup>TM</sup> <sup>5</sup> od britské GlaxoSmithKline (GSK). Produkce těchto vakcín je momentálně založena na kvasinkovém (Silgard) a baculomavirovém (Cervarix) expresním systému.

Nejúčinnější je očkovat děti a mladistvé, kteří ještě nezapočali svůj sexuální život. V září 2009 Evropská komise schválila informaci o účinnosti vakcín i u žen mezi 24 – 45 lety. Pravidelná preventivní vyšetření jsou nutná i po očkování (Mouková, Feranec and Chovanec 2010).

Komerční vakcína je založena na neinfekčních, viru podobným částicím (virus-like particle, VLP), obsahujících L1 kapsidový protein. Ve výzkumu se ale pracuje i s L1/L2 VLPs. VLPs jsou produkovány pomocí rekombinantních metod a podávány v přítomnosti adjuvans. Výhodou je schopnost L1 proteinů se samostatně uspořádat do virionů bez přítomnosti virové DNA. Oba typy komerčních vakcín jsou podávány ve třech dávkách a vyvolávají silnou protilátkovou imunitní odpověď, která je až 100 x vyšší než při přirozené imunizaci (Villa et al. 2006), navíc pouhých 50 - 60 % žen je po přirozené nákaze schopno vytvářet neutralizační protilátky (Carter et al. 2000). L1 protein je bohužel strukturně velmi heterogenní - podle genotypu PV (např. HPV31 nevyžaduje pro vazbu HSPG). Navíc existuje více vzorů glykosylace HSPG. Oproti tomu L2 se zdá být strukturně homogenní, teoreticky by tedy měly být vakcíny založeny hlavně na L2 kapsidových proteinech, ty jsou ale bohužel jen velmi málo imunogenní. L1 VLPs jsou mnohem efektivnější, jelikož u L1/L2 VLP je epitop na L2 odhalen až po vazbě na HSPG a furinovém štěpení – L2 epitop je ve složené kapsidě subdominantní. Nicméně výzkum vakcín zahrnujících L2 protein stále pokračuje. Skrývá se v něm potenciál relativně levné polyvalentní ochrany vůči všem kožním i slizničním typům papillomavirů (Pastrana et al. 2005). Snahy jsou směřovány zejména ke zvýšení jejich imunogenicity vývojem vhodných adjuvans (rev. Schiller and Lowy 2006, Cutts et al. 2007).

---

<sup>5</sup> Firma GlaxoSmithKline prohlašuje, že byla prokázána zkřížená ochrana i proti HPV31, 45 a 52 (<http://www.gsk.cz/pro-novinare/zpravy/vakcina-cervarix.html>).

V České republice byla poprvé použita vakcína Silgard 5. 12. 2006 v Brně. Dalo by se tedy říct, že se u nás očkuje od roku 2007. Účinnost vakcíny je prokázána po dobu 5,5 let (Silgard) a 6,4 let (Cervarix) (Mouková et al. 2010). Avšak zásadní data se objeví až v budoucnu, jelikož ve světě probíhá rozsáhlejší očkování zhruba pouhých 10 let.

V současnosti je asi největší problém cena vakcín, která brání rozsáhlejšímu přeočkování populace. V České republice se cena pohybuje okolo 3 200 – 3 700 Kč za jednu dávku. Jednotlivé pojišťovny přistupují k úhradě očkování různými způsoby. V ČR v současnosti není žádná zdravotní pojišťovna, která by očkování plně hradila.

### **3.2. Terapeutické vakcíny**

Výše zmiňované vakcíny jsou bohužel pouze preventivní. Nedokáží tedy zastavit již propuknuté onemocnění začínající tvorbou lézí ani časný průběh po infekci. Proti HPV 16 a 18 jsou schopny chránit s více než 90% účinností, avšak tyto sérotypy jsou zodpovědné jen za asi 70 % případů karcinomu děložního čípku. Proto je v současné době pozornost zaměřena na vývoj terapeutických vakcín, které by podpořily antigen-specifickou T-buněčnou imunitní odpověď do takové míry, že by byla schopna eliminovat napadené buňky. Vhodnými cílovými antigeny pro terapeutické vakcíny jsou virové E6 a E7, produkovány stabilně po celou dobu infekce. Tyto vakcíny se v současnosti vyvíjí (shrnutí v Hung et al. 2007, Boulet et al. 2007).

Klíčovou roli při interakci viru s hostitelem hrají dendritické buňky, jejichž prostřednictvím začíná antigen-specifická antivirová humorální a na T-lymfocytech založená protinádorová imunitní odpověď. Během přirozené infekce HPV doslova kličkuje před imunitním systémem. Virové částice přijdou jen málo do styku s lymfatickými uzlinami, kde je imunitní odpověď iniciována. Virus totiž stačí buňky infikovat ještě před svým rozeznáním a v konečné fázi viru jsou uvolněné viriony z keratinocytů rychle eliminovány ze slizničního povrchu. Navíc Langerhansovy buňky<sup>6</sup> a makrofágy nedokáží rozeznat počáteční stádia po infekci, jelikož virus není pro buňky bazální epidermis cytolytický a imunocyty tak nejsou přilákány zánětlivými chemoatraktanty (Fausch, Da Silva and Kast 2003). Pokud ale inokulujeme VLPs intramuskulárně, dojde ve vysoké míře k jejich kontaktu s lymfatickými uzlinami a APCs (antigen-prezentující buňky) mohou aktivovat antigen-specifickou imunitu. Zejména CD4<sup>+</sup>

---

<sup>6</sup> Langerhansovy buňky – dendritické buňky patří mezi antigen-prezentující buňky (APC), které pohlcují mikrobiální antigeny a poté je předkládají naivním T-lymfocytům. Nalézají se hlavně v epidermis.

Th2<sup>7</sup> lymfocyty, které pak podporují naivní B-lymfocyty v jejich diferenciaci v plasmatické buňky, produkující velká množství protilátek, a v paměťové B-buňky. Terapeutické vakcíny by na rozdíl od VLPs měly dostatečně stimulovat buněčnou Th1 zánětlivou odpověď, tedy makrofágy a cytotoxické CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, které jsou schopny zlikvidovat buňky pozitivní na expresi E6 či E7 DNA. K této stimulaci ve velké míře přispívají adjuvans přidaná do vakcín obsahující cytokiny a kostimulační molekuly. Zde je nutno zmínit, že vývoj vhodných adjuvans ke stimulaci a rozvoji správné imunitní odpovědi bude pro budoucnost HPV vakcín rozhodující. Pouze dokonalé porozumění mechanismů jejich působení dovolí jejich správné použití v profylaktických, terapeutických či orálně podávaných vakcínách stimulujících imunitu sliznic (shrnutí v Stanley, Gissmann and Nardelli-Haeffliger 2008).

Výsledky několika studií ukázaly, že potenciální terapeutické HPV vakcíny jsou schopny zlikvidovat nádory v myších modelech (He et al. 2000). Terapeutika ve formě E6 a E7 onkoproteinů bohužel měla terapeutické účinky pouze u časných stádií karcinomu a u žen s pokročilou rakovinou byla léčba neúspěšná (Adams et al. 2001). Výsledky pokusů s indikacemi terapeutických vakcín jsou bohužel doposud limitovány tím, že napadené buňky na svém povrchu prezentují virové antigeny jen velmi slabě a navíc, jak už bylo řečeno, nedochází k přilákání efektorových T-buněk bez zánětlivého podnětu. Je zřejmé, že pro zvýšení imunogenicity je důležitý vývoj vhodných adjuvans podporujících transport efektorových buněk do epitelů (Gerard et al. 2001). Překonání těchto bariér je nutnou podmínkou pro úspěšnou léčbu HPV karcinomů.

HPV16 E7 protein již byl transientně exprimován v *Nicotiana benthamiana* pomocí PVX (potato virus X) vektorů – rostlinný extrakt poté indukoval výraznou buněčnou i humorální anti-E7 imunitní odpověď u očkovaných myší a chránil je před rozvojem tumorů. Asi nejdůležitější je ale to, že rostlinné extrakty spolu s adjuvans měly u myší signifikantně vyšší profylaktický i terapeutický efekt než E7 vakcíny s adjuvans z *Escherichia coli* expresního systému. Tyto rostlinné vakcíny preventivně chránily zvířata před nádory se 100% účinností a překvapivě z 80 % bez adjuvans. Oproti tomu bakteriální vakcíny měly jen 60% a 80% účinnost a bez adjuvans pouze 20%. To vypovídá o vysoké imunogenicitě a potenciálu rostlin, co se týče profylaktických i terapeutických vakcín (Massa et al. 2007).

---

<sup>7</sup> Th2 imunitní odpověď stimuluje B-buňky, Th1 stimuluje makrofágy. CD4 receptory imunocytů interagují s MHC II, CD8 receptory s MHC I molekulami vystavujícími antigeny na povrchu buněk.

### 3.3. Budoucí generace vakcín proti HPV – „druhá generace“

Současný vývoj se ubírá směrem neinvazivní imunizace, tedy bez použití injekcí. Princip je založen na styku antigenu s povrchem sliznic – ideálně trávicího traktu, dále dýchacích cest či rekta. Takové vakcíny by se pak podávaly ve formě kapslí, aerosolu či gelu, přesně dávkované na určitou koncentraci antigenu. Hlavní výhody spočívají v jednoduchosti použití, ceně, možnosti pročkovat daleko větší počet lidí a ve snazším uskladnění bez nutnosti nízkých teplot jako u injekčních vakcín. Velký význam by měly pro chudé oblasti světa, kde se při podávání farmaceutik prostřednictvím jehel roznáší další infekční nemoci, nejčastěji kvůli opakovanému používání jehel. V těchto oblastech jsou levná a orálně podávaná biofarmaceutika umožňující rozsáhlé očkování velmi žádaná.

Při orálním podávání jsou však nutné vyšší (přibližně 100 x) dávky antigenu pro vzbuzení dostatečné imunitní odpovědi. Díky rostlinným expresním systémům těchto vyšších dávek můžeme levně a relativně rychle dosáhnout. Největší potenciál a šanci na rychlé prosazení mají v zemích třetího světa. Ale ve vyspělých zemích směřuje vývoj vakcín také spíše k neinvazivním formám aplikace. Už jen proto, že pro pacienta je samozřejmě daleko příjemnější možnost přijímat očkování orálně namísto bolestivých injekcí. Cena a jednoduchá forma podávání by navíc mohly pomoci při zavedení komplexních očkovacích programů proti HPV (rev. Stanley et al. 2008, Schiller and Nardelli-Haeffliger 2006).

Bylo prokázáno, že spolu s vhodnými adjuvans orálně podávané VLP vakcíny dokáží být dostatečně imunogenní (Gerber et al. 2001, Rose et al. 1999). Výhodou očkování prostřednictvím sliznic je, že kromě sérových IgG a IgA dochází i k tvorbě sekterorických slizničních IgA (sIgA) na povrchu všech sliznic včetně genitálu, což by mělo zvýšit účinnost vakcín (zejména v době ovulace, kdy v ženském těle klesá množství IgG). Avšak úplnou ochranu vůči HPV samotné sIgA neposkytují (Nardelli-Haeffliger et al. 2003).

V gastrointestinálním traktu je většina antigenů imunitním systémem přehlížena. Ve střevním epitelu se však nacházejí specializované enterocyty - M-buňky<sup>8</sup>. M-buňky selektivně vybírají antigeny, jako například virové částice, a pomocí transcytózy je transportují do folikulů (Peyerovy pláty) k dalšímu předložení APCs (Neutra, Pringault and Kraehenbuhl 1996). Na této „vybíravosti“ M-buněk je tak založena úspěšnost VLP vakcín při orálním užívání. V buňkách

---

<sup>8</sup> M-buňky – epitelové buňky na vnitřní straně střeva, součástí GALT – gut-associated lymphoid tissue (lymfoidní tkáň asociovaná se střevem)

transgenních rostlin se VLP dokáží samovolně složit stejně tak jako v buňkách živočišných. Robustní celulózová stěna rostlinné buňky navíc chrání VLPs před nízkým pH žaludku, takže se mohou bez poškození dostat až do střeva. Bylo dokonce zjištěno, že samy VLPs jsou relativně odolné vůči prostředí gastrointestinálního traktu (Rose et al. 1999). Orální očkování proti HPV pomocí vakcíny produkované v rostlinách je tedy principiálně možné, nicméně je zapotřebí ještě dalšího výzkumu.

## **4 Rostlinné expresní systémy, jejich výhody a nevýhody**

Rostliny pro své pěstování nepotřebují složité a na údržbu drahé fermentory jako bakterie, které jsou v současnosti nejčastěji používanými expresními systémy pro produkci farmaceutik. Rostliny mají pouze základní požadavky na dostatek světla, vody a živin. Rostliny jsou jednoduše transformovatelné a technologie je již schopna vytvořit plodiny pro rozsáhlou agrikurní produkci biofarmaceutik. Rostlinné buňky jsou eukaryotické stejně tak jako živočišné, což má mnoho výhod oproti prokaryotickým expresním systémům. Exprimované proteiny opatřují eukaryotickými post-translačními modifikacemi a je zde možnost využití subcelulárního cílení proteinů do určitých organel pro zvýšení hladiny rekombinantního proteinu. Cílení exprese do zásobních orgánů (semena, hlízy, apod.) také zaručuje velmi vysokou a koncentrovanou produkci proteinu zájmu (Conrad et al. 1998). Endosperm semen navíc umožňuje přirozené a stabilní skladování proteinu, který tak může vydržet v nezměněné a aktivní formě i několik let.

Naproti tomu při produkci rekombinantních proteinů v prokaryotech je nutno nákladně odstranit i stopová množství endotoxinů pocházející z buněčných stěn zejména gramnegativních bakterií. Endotoxiny totiž mohou způsobovat nebezpečné zánětlivé reakce. Mnoho eukaryotických proteinů je v bakteriích produkováno v denaturované formě v inkluzních těliscích. To vše velmi snižuje výnosy a vyžaduje další nákladné zpracování (Chen et al. 2001, Lai and Middelberg 2002). Další výhodou rostlin oproti prokaryotům je to, že jsou schopny exprimovat a správně prostorově skládat multimerní proteiny jako například imunoglobuliny (Hiatt, Cafferkey and Bowdish 1989). U rostlin je téměř nulové riziko kontaminace živočišnými patogeny (viry a priony) a onkogenními DNA sekvencemi. Asi finančně nejnákladnějším krokem je purifikace, ta se ale může buď částečně, nebo úplně obejít orálním podáváním (tzv. jedlé vakcíny), pokud je transformovaná rostlina jedlá. Všechny tyto výhody



podstatně snižují náklady na produkci rekombinantních proteinů v rostlinách – a právě cena omezuje dostupnost léčiv pro většinu lidské populace (shrnutí v Daniell, Streatfield and Wycoff 2001b).

Velmi důležitá je otázka bezpečnosti transgenních neboli geneticky modifikovaných organismů (GMO), na kterých je produkce biofarmaceutik závislá. Jeden z důležitých aspektů výzkumu využití rostlin pro produkci farmaceutických proteinů je snaha minimalizovat možné uniknutí transgenů do volné přírody a případnou akumulaci jejich produktů v živých organismech – toto nebezpečí hrozí zejména u virových vektorů. Transgenní rostliny také představují možné riziko, zejména v případě zkřížení s příbuznými rostlinami prostřednictvím transgenního pylu či uniknutí semen do volné přírody. Pokud nebudou otázky úniku transgenů mimo zamýšlenou biomasu vyřešeny, nelze počítat s podporou veřejnosti pro tento způsob využití transgeneze. Výzkum je v současné době zaměřen právě na metody kontroly transgenů a snaží se vytvořit co nejbezpečnější GMO. Konkrétně se zkoumají možnosti využití: apomixie<sup>9</sup>, nekompatibilních genomů, kontroly dormance a klíčení semen, sebevražedné geny, bariéry zapříčiňující neplodnost, samčí sterilita, maternální dědičnost a další. Mezi velmi výhodný a přirozený přístup patří transformovat jen autogamicky (pomocí samoopylení) se rozmnožující rostliny (Stoger et al. 2002) nebo zvolit chloroplastovou transformaci, jelikož plastom se normálně dědí maternálně. Existuje ale několik výjimek, kdy se plastidy přenášejí na potomstvo prostřednictvím pylu (např. *Pinus*) (Daniell et al. 1998). Tyto metody tak velice přirozeně řeší otázku nebezpečnosti GMO z hlediska jejich šíření do okolí. Další potenciálně kontroverzní součástí většiny transgenních rostlin je přítomnost antibiotických selekčních markerů. Již dnes však existují metodiky pro transformaci jak jaderného (Puchta 2000), tak chloroplastového (Daniell, Muthukumar and Lee 2001a) genomu bez použití antibiotické selekce. Další možnou bariérou proti úniku transgenů je uzavřené pěstování ve sklenících za přísně kontrolovaných podmínek (shrnutí v Daniell et al. 2001b).

Požadavky na množství vyprodukovaných farmaceutik se neustále zvyšují. Současné systémy tuto poptávku nemohou v budoucnu pokrýt. Potenciál se tedy skrývá v rostlinných expresních systémech, které dokáží produkovat velká množství rekombinantních proteinů za relativně krátkou dobu. Cena produkce rekombinantních proteinů v rostlinách se odhaduje na 10 % ceny bakteriální produkce a 0,1 % ceny savčích buněčných kultur, podle zvoleného systému.

---

<sup>9</sup> Apomixie – způsob nepohlavního rozmnožování, kdy sice vznikají pohlavní orgány, nedochází v nich však k oplození. Vzniklá semena jsou tedy identická s mateřskou rostlinou.

Výtěžky farmaceutických proteinů v rostlinách se dnes pohybují v řádech jednotek % TSP<sup>10</sup>. Náklady na purifikaci proteinů jsou všech tří expresních systémů podobné (rev. Hood, Woodard and Horn 2002).

V případě rostlinných systémů založených na infekci rekombinantními viry, existuje možnost výrazně urychlit produkci rekombinantních proteinů v rostlinách. Celý proces od návrhu vhodného rekombinantního konstruktu, přes samotnou transformaci a produkci ve středním nebo velkém měřítku, až po izolaci proteinu v relevantním množství lze stihnout v průběhu několika málo měsíců (rev. Gleba, Klimyuk and Marillonnet 2007).

## 5 Způsoby modifikací rostlin

Transformace rostlin můžeme rozdělit na dva základní typy. První typ vytváří stabilní transformanty – transgenní rostliny. Cizí gen je stabilně inkorporován do rostlinného genomu a na potomky je přenášén dle Mendelových zákonů dědičnosti. Stabilních transformantů se docílí vložením optimalizovaného vektoru do genomu jádra či organel, například do genomu chloroplastů. Rekombinantní DNA vektoru se integruje do jaderného či plastidového genomu. Po selekci se z jedné takto transformované rostlinné buňky pomocí technik tkáňových kultur vypěstuje celá fertilní rostlina.

Druhým typem je tzv. transientní (přechodná) exprese genu v rostlině. V tomto případě jsou netransgenní rostliny infikovány rekombinantními viry. Dochází k mnohonásobné transformaci celého rostlinného pletiva (nejčastěji listu). Výsledná exprese transgenu probíhá přímo v transformovaném pletivu, aniž by byla nutná selekce celé homogenní transgenní rostliny.

### 5.1. Stabilní jaderná transformace

Stabilní transformace bývá nejčastěji dosaženo pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Tato bakterie je přirozený patogen rostlin. Obsahuje Ti-plasmid (tumour inducing), jehož část (T-DNA, transferred) je během infekce buňky zabudována do hostitelského genomu. Onemocnění způsobené *Agrobacteriem* se projevuje růstem tumorů z pletiv stonku rostlin.

---

<sup>10</sup> TSP = total soluble protein, tj. procentuální množství požadovaného proteinu na celkovém rozpustném proteinu

Tumory jsou tvořeny infikovanými buňkami, ve kterých v přítomnosti T-DNA došlo k hormonální deregulaci. Nadbytek rostlinných hormonů auxinů (stimulují prodlužování buněk) a cytokininů (stimulují dělení), tak podporuje růst tumorů. T-DNA je na obou stranách ohraničena repetitivními sekvencemi, pomocí nichž se integruje do genomu, dále obsahuje geny pro opiny, které jsou následně specificky metabolizovány bakterií (shrnutí v Zupan et al. 2000). Tato přirozená cesta je využita pro transformaci rostlinných buněk. Nejprve se vytvoří modifikované bakterie, do jejichž T-DNA se vloží požadovaný gen, a jimi se následně infikují rostliny. Po infekci těmito bakteriemi se T-DNA zabuduje prostřednictvím nehomologní rekombinace do náhodného místa rostlinného genomu. Z každé jednotlivé úspěšně transformované buňky se pomocí sterilních technik *in vitro* vypěstuje celá rostlina. Vzniká tak mnoho variabilních linií s rozličným stupněm exprese.

Transformace pomocí *Agrobacteria* je však u některých rostlin, jako jsou jednoděložné rostliny nebo dřeviny obtížná. Druhou možností je použít biolistickou metodu (mikroprojectile bombardement). Obvykle se používají zlaté nebo wolframové částice o velikosti několika málo mikrometrů, obalené purifikovanou DNA. Tyto částice jsou poté nastřeleny do rostlinných buněk pomocí stlačeného helia. Po tomto procesu je prováděna selekce úspěšně transformovaných buněk, které se dále kultivují buď v podobě buněčných suspenzí nebo rostlin (Maenpaa et al. 1999).

Výhodou transformace prostřednictvím *Agrobacteria* je, že většina transformantů má jednu nebo nízký počet kopií transgenů v genomu, snižuje se tak riziko umlčení transgenů po několika generacích. Při biolistické metodě často dochází k mnohonásobnému zabudování DNA do genomu (Hobbs, Warkentin and Delong 1993). To může za určitých okolností vést k vysoké míře exprese, ale také je to často spojeno s umlčením genu (gene silencing) (Vaucheret et al. 1998). Alternativou, jak dosáhnout v transgenní rostlině vyšších výtěžků, je stabilně vložit do genomu virový replikon pod kontrolou silného promotoru a řízený inducibilním promotorem. V současné době pracuje mnoho skupin na vyvinutí různých verzí takovýchto virově-inducibilních systémů (Dohi et al. 2006).

Ačkoliv je jaderná transformace u některých rostlinných druhů dnes již rutinní záležitostí, má nevýhodu délky trvání celého procesu transformace, která je delší než u transientní exprese a mohla by být nevýhodou v případě nutnosti rychlé produkce farmaceutik. Takové transgenní rostliny jsou výhodné spíše pro produkci rekombinantních proteinů se stabilní dlouhodobou poptávkou (protilátky, enzymy atd).

## 5.2. Stabilní chloroplastová transformace

Pro vnesení DNA do plastomu se také využívá biolistická metoda (Svab and Maliga 1993). V každé rostlinné buňce se nalézá velké množství (až několik tisíc) chloroplastů. Po úspěšné transformaci plastomu a namnožení chloroplastu, tak může dojít k daleko silnější expresi. Úroveň exprese u transplastomických rostlin je vyšší než u jaderně transformovaných rostlin. Jedná se o desítky procent a například u transformace rajčete bylo v chloroplastech plodů dosaženo více než 40 % TSP (Ruf et al. 2001). Během inkorporace cizí DNA do plastomu dochází k homologní rekombinaci pomocí dvou přilehlých sekvencí do přesně definovaného místa. Tím je zaručena stejná exprese genu u všech transformantů a zabráněno „pozičnímu efektu“, který ovlivňuje expresi vložených genů – což je častý jev u jaderné transformace. Chloroplasty mají oproti jádru mnoho dalších výhod: dosud v nich nebyl pozorován gene silencing, možnost exprese více genů po jediné transformaci (De Cosa et al. 2001), rekombinantní proteiny se akumulují v chloroplastech - v případě jejich toxicity tedy neškodí hostitelské rostlině a přenos transgenu je omezen maternální dědičností plastomu, příroda je tedy před transgeny přirozeně chráněna. Díky chaperonům přítomným v chloroplastech, je umožněno správné sbalení eukaryotických a prokaryotických proteinů i jejich správné opatření disulfidickými můstky (Kim and Mayfield 1997). Není tedy nutná drahá chemická *in vitro* úprava produktu. Tento způsob transformace má ale i svá omezení - v plastidech nedochází k eukaryotickým modifikacím proteinů. Z tohoto důvodu jsou chloroplasty zatím nevhodné pro produkci proteinů vyžadujících tyto modifikace (shrnutí v Daniell et al. 2001b, Daniell, Khan and Allison 2002).

Dosáhnout stabilní chloroplastové transgenní rostliny je velmi obtížné a není to úplně rutinní záležitost, jelikož je nutná náročná selekce homoplasmických buněk, obsahujících pouze transformované chloroplasty. V heteroplasmických<sup>11</sup> buňkách se totiž nalézají, kromě transformovaných, také wild-type chloroplasty, které nejsou geneticky zatíženy a dělí se rychleji. V explantátové kultuře z této buňky poté dochází při dělení k postupnému naředění počtu transformovaných chloroplastů a časem ke ztrátě schopnosti exprese transgenu.

Po první stabilní chloroplastové transformaci *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton et al. 1988) byl v roce 1990 transformován také tabák (*Nicotiana tabacum*) (Daniell et al. 1990, Svab,

---

<sup>11</sup> Heteroplazmie – přítomnost více než jednoho typu organelových genomů v jedné buňce či jedinci. V buňce tak může být například několik genotypově odlišných chloroplastů či mitochondrií. V přírodě dochází k heteroplazmii přirozeně pomocí mutací.

Hajdukiewicz and Maliga 1990). Od té doby u něj technologie pokročila nejdále a byl nejčastěji využíván k produkci rekombinantních proteinů. Je ale známo mnoho dalších stabilních chloroplastových transformací vyšších rostlin jako je například rajče (Ruf et al. 2001), huseníček (*Arabidopsis thaliana*) (Sikdar et al. 1998), řepka olejka (Hou et al. 2003), rýže (Lee et al. 2006), brambora (Sidorov et al. 1999), sója (Dufourmantel et al. 2004), bavlna (Kumar, Dhingra and Daniell 2004b), *Lesquerella fendleri* (*Brassicaceae*) (Skarjinskaia, Svab and Maliga 2003), salát (Lelivelt et al. 2005) a mrkev (Kumar, Dhingra and Daniell 2004a). Škála rostlin využitých k tomuto způsobu transformace se neustále rozšiřuje, zejména díky metodám somatické embryogeneze.

Již byla vyzkoušena i stabilní transplastomická produkce HPV16 L1 proteinu v tabáku. V chloroplastech rostlin se L1 proteiny byly schopny samy skládat do kapsomer a množství TSP v rostlinách překračovalo 1,5 %. Při čemž byla potvrzena sterilita pylu (Waheed et al. 2011). Tento velmi výhodný transformační systém se tak nově rozvíjí i v oblasti HPV vakcín.

### 5.3. Transientní (přechodná) transformace

Transientní transformace rostlin má význam zejména ve výzkumu, například při ověřování konstruktů či pro biochemickou analýzu malých množství rekombinantních proteinů (Stoger et al. 2002). Transientní exprese může být dosaženo mnoha způsoby. Jedním z nich je vakuová infiltrace (agroinfiltrace) listů *Agrobacteriem*, které způsobí vysoký stupeň exprese transgenu ve velkém množství buněk po krátkou dobu. Metoda bohužel není příliš vhodná pro komerční použití, jelikož k gene silencingu dochází již po několika dnech (Vaquero et al. 2002). Byla ale vyvinuta metoda, při které je ko-exprimován některý ze supresorů silencingu - například protein p19<sup>12</sup> způsobující nárůst doby a exprese proteinu v agroinfiltrovaných listech více než padesátkrát (Voinnet et al. 2003).

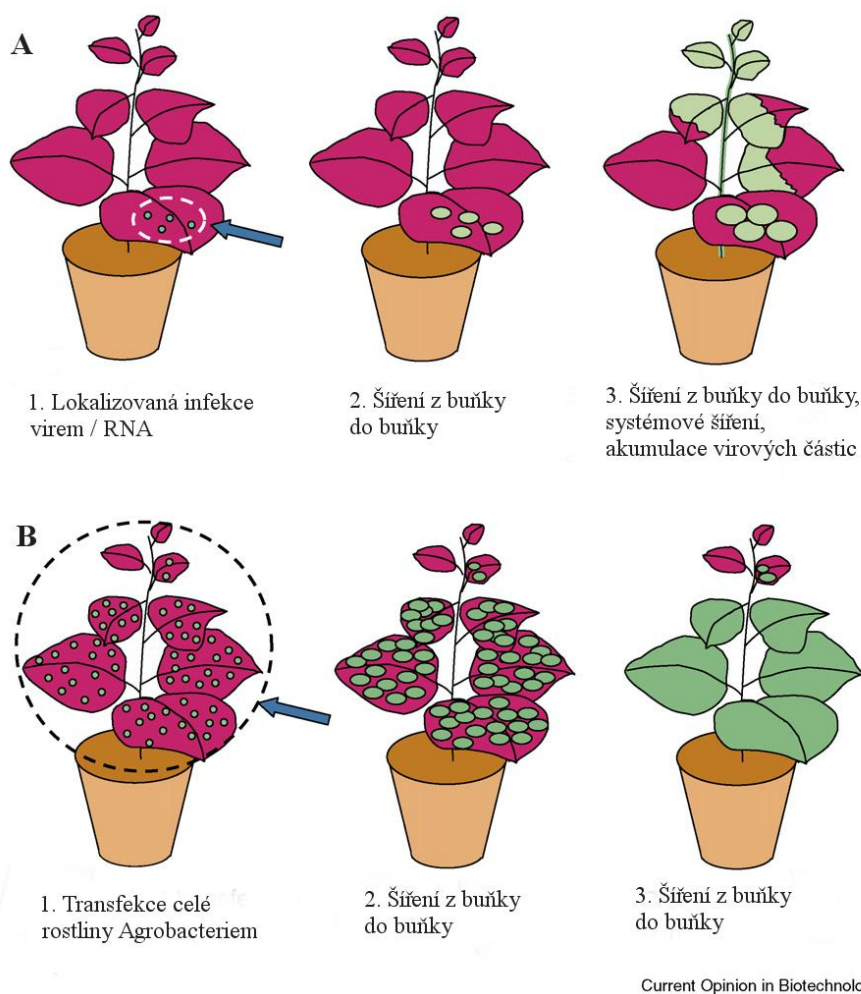
Nejčastěji se pro transientní expresi používají rekombinantní rostlinné viry. Téměř výhradně se jedná o viry infikující vyšší rostliny s +ssRNA genomem. Při běžné infekci se virová RNA neinkorporuje do genomu, ale zůstává v cytoplasmě hostitelské buňky, kde je amplifikována virovou replikázou. Virus většinou nedokáže napadat semena, virové infekce tak nejsou zpravidla vertikálně přenosné na potomstvo. Virus v rostlině způsobí systémovou infekci většiny pletiv rostliny a ovládne transkripční a translační aparát. Je přitom zpravidla dosahováno vyšší exprese požadovaného genu v porovnání se stabilní transformací. V jedné rostlině může být dokonce použit více než jeden vektor a mohou tak být sestavovány i

---

<sup>12</sup> p19 – supresor post-transkripčního umlčování genů pocházející z viru rajčat (tomato bushy stunt virus)

multimerní proteiny (Verch, Yusibov and Koprowski 1998). Hlavní výhody použití rostlinného viru tkví v krátké době virového cyklu, produkce proteinu je tedy poměrně rychlá a kvantitativní. Další výhodou může být široká škála hostitelů umožňující expresi genu v různých rostlinných druzích s použitím stejného vektorového konstruktu. Mezi nevýhody patří to, že musí být každá rostlina jednotlivě inokulována, což vyžaduje více mechanické práce (McCormick et al. 2003). Nicméně se tato metoda neustále vyvíjí (shrnutí v Giddings et al. 2000, Koprowski and Yusibov 2001).

První generace virových vektorů (tzv. full-virus strategy) je založena na použití funkčního viru, který kromě svých vlastních genů exprimuje navíc vložený úsek RNA. Transgen je exprimován buď pod kontrolou silného promotoru (nejčastěji subgenomový promotor kapsidového proteinu) nebo jako fúzní protein. V případě fúzního proteinu je vložena krátká sekvence peptidu do sekvence virového kapsidového proteinu (CP) tak, aby byla zachována jeho schopnost tvorby virových partikulí a přitom na svém povrchu vystavovat požadovaný epitop. Samotná infekce rostlin se nejčastěji provádí prostřednictvím rekombinantních virionů či infekčních řetězců RNA smíchanými s karbidem křemíku, který se jinak používá i jako brusný materiál. Tato směs se nanáší na listy rostlin a lehce mechanicky se rozetře – prášek vytvoří v buněčných stěnách oděrky, kterými se může virus dostat do buněk. Podle schopnosti infekтивности virového vektoru trvá 2 – 3 týdny než je dosaženo infekce většiny buněk rostliny. Nikdy však není infikována celá rostlina a exprese transgenu je v různých buňkách asynchronní, což snižuje výnosy. Jako první a nejčastěji využívaný virus pro rekombinaci a následnou infekci hostitele je používán virus tabákové mozaiky (TMV, Tobacco Mosaic Virus) (Usha et al. 1993, Fitchen, Beachy and Hein 1995, Palmer et al. 2006). Velkým omezením rostlinných virů je, že po vložení inzertu většího než 1 kbp může docházet ke ztrátě části nebo celého transgenu (Avesani et al. 2007). To se prokázalo i u pokusů s transientní expresí L1 HPV16 proteinu (1,5 kbp), kdy bylo dosaženo výsledků nižších než u transgenních rostlin (Varsani et al. 2006). Kvůli tomuto omezení bude obtížné použití této metody pro produkci některých větších rekombinantních proteinů. Podobné omezení existuje i pro fúzi epitopu s virovým obalovým proteinem proto, že po překročení určité velikosti nemusí dojít ke správnému formování virových částic a prezentaci epitopu. Například u TMV by neměl být vložený peptid větší než 20 - 25 AKs, existují ale i viry schopné pojmout větší inzert, a dokonce i více epitopů, jako je například virus mozaiky vojtěšky (AIMV) (Yusibov et al. 1997).

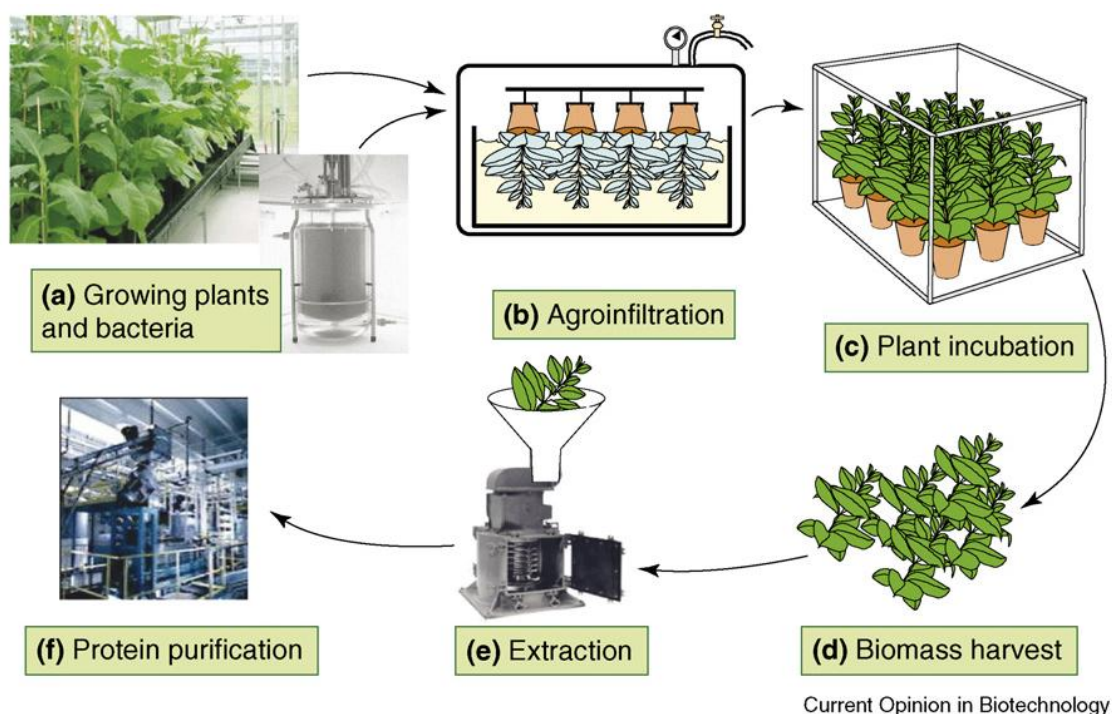


Obrázek 4.: Schematický popis infekce a šíření replikonů založených na (A) první generaci a (B) druhé generaci virových vektorů (převzato a upraveno podle rev. Gleba et al. 2007).

Pro první generaci vektorů je velkým omezením maximální možná velikost inzertu a nízká schopnost systémového šíření, kdy samotný virus není prostřednictvím svého CP schopen infikovat všechny buňky rostliny a výtěžky tak klesají. Druhá generace virových vektorů se snaží tyto nedostatky překonat a spočívá v přestavbě virového genomu. Z viru jsou tak odstraněny některé původní geny a ty jsou nahrazeny požadovaným konstruktem. Chybějící funkce jsou potom buď komplementovány *in trans* pomocí transgenní rostliny, pomocným virem nebo nejsou doplněny vůbec. Tento přístup kombinuje výhody tří biologických systémů: vysokou transfekční účinnost *Agrobacteria*, rychlost a vysoký stupeň exprese viru a post-translační modifikace spolu s nízkou cenou rostlin. Do *Agrobacteria* se vloží virový vektor, který má silně exprimovanou sekvenci CP nahrazenou sekvencí pro požadovaný protein. Bakteriemi se poté infikují rostliny. Množství efektivně transformovaných buněk lze ještě zvýšit vložením rostlinného intronu do sekvence viru. Po inzerci virové cDNA do

genomu rostliny se totiž není virová RNA často schopna dostat z jádra do cytosolu. Cytosolické RNA rostlinné viry totiž normálně nikdy nevstupují do jádra a nemají svou RNA nijak přizpůsobenou jadernému prostředí, velmi často tak dochází k sestřihu virové RNA na místech kryptických intronů a tím k nefunkčnosti celého replikonu. Rekombinantní *Agrobacterium* nesoucí tyto modifikované virové vektory v T-DNA je pak schopno úspěšně infikovat rostliny a rychle transfekovat více než 93 % všech buněk v listu. Navíc, když virový vektor neobsahuje CP sekvenci, lze do něj vložit i větší inzert (přes 2,3 kbp, tj. asi 80 kDa proteinu). Tento postup transientní produkce heterologních proteinů v rostlinách se nazývá magnifekce a pro jeho komerční využití existuje obecný protokol, kdy se infekce rostlin *Agrobacteriem* obsahujícím provirus provádí prostřednictvím vakuové infiltrace: celé vzrostlé rostliny či oddělené listy jsou ponořeny do velmi zředěné suspenze bakterie za současného podtlaku (cca – 0,8 – 0,9 bar) po dobu 10 – 30 s. Amplifikace vektoru v jednotlivých buňkách a následné šíření do dalších buněk se děje prostřednictvím replikonů. Podle použitého vektoru, hostitelského organismu a hustoty bakterie v suspenzi proces trvá 4 – 10 dní a dle produkovaného proteinu mohou být výtěžky i přes 50 % TSP. Tato velmi rychlá a výkonná metoda produkce proteinů může být velmi dobře aplikovaná a již bylo takto exprimováno více než 50 různých typů farmaceutik. Je ale důležité podotknout, že u všech transientních metod, využívajících živé rekombinantní *Agrobacterium* jako vektor, není možné komerční pěstování na volném poli kvůli velmi pravděpodobné kontaminaci prostředí GMO, potenciál má proto zatím jen v uzavřených sklenících, což je o něco finančně nákladnější (Marillonnet et al. 2005, Gleba, Klimyuk and Marillonnet 2005). Podobný postup, ale s využitím PVX již byl také popsán (Komarova et al. 2006).





Obrázek 5.: **Obecné schéma produkce rekombinantních proteinů v rostlinách pomocí magnifekce.**

Fáze (a), (e) a (f) jsou standardní průmyslové procesy, fáze (b), (c) a (d) jsou nové, dosud průmyslově nezaběhnuté procesy (převzato z rev. Gleba et al. 2007).

Další metody využívají virové partikule tobamovirů jako jakási lešení vhodná pro ověšení antigeny. Tobamoviry byly vybrány pro jejich jednoduchou biopolymerní strukturu, velmi vysokou akumulaci v infikovaných pletivech (10 g/kg) a jednoduchou purifikaci. Nejznámější a nejprostudovanější tobamovirus je TMV s 6,4 kbp ssRNA genomem kódujícím čtyři proteiny. Kapsidy TMV jsou složeny z 2100 monomerů CP obalujících genomovou RNA. Tyto vlastnosti tobamovirů dávají příležitost k jejich aplikaci v nanobiotechnologiích. Asi nejjednodušší metoda je založena na vytvoření reaktivního lysinu na externě lokalizovaném N-konci CP TMV, který umožňuje snadnou chemickou modifikaci kapsid – v tomto případě biotinylation<sup>13</sup>. Na částice se poté prostřednictvím chemické vazby mezi biotinem a strepavidinem naváže fúzní antigen (obvykle pocházející z transgenních rostlin). Takto mohou být virové částice „vyzbrojovány“ různými antigeny a sloužit jako vakcíny, které mají mnohem vyšší schopnost imunogenicity než samotné antigeny. Byla popsána úspěšná exprese několika různých epitopů na povrchu TMV a jejich imunogenní účinnost byla potvrzena na zvířecích modelech (Werner et al. 2006). Na TMV částici lze dokonce připojit i velký protein

<sup>13</sup> Biotinylation – proces kovalentního navázání biotinu k proteinu či nukleové kyselině. Biotin má vysokou afinitu k strepavidinu a avidinu, čehož se využívá k izolacím a spojování molekul, tak jako ve výše popsaném případě.

jako například L2 protein orálního PV psů. Tyto chimerické částice vyvolaly u inokulovaných myší podstatně vyšší protilátkovou odpověď (Smith et al. 2006, McCormick et al. 2006) než samostatný L2 protein. Tímto způsobem by se tedy mohly vyrábět jednoduše a rychle multiepitopové komplexy sloužící jako vakcíny.

Další způsob, jak využít schopnost rostlin produkovat správně složené heterooligomerní proteiny (např. protilátky) transientní metodou, je infekce rostliny dvěma virovými vektory současně, z nichž každý exprimuje část proteinu. Vektory jsou odvozeny ze dvou různých nekompetitivních virů (např. TMV a PVX), které jsou schopny, na rozdíl od vektorů odvozených ze stejného viru, úspěšně ko-exprimovat různé podjednotky proteinu v jedné buňce (Giritch et al. 2006). Tento způsob má vysoké výtěžky (přes 0,5 g/kg) plně funkčních proteinů a první gramy materiálu můžou být sklizeny za méně než dva týdny (Hiatt and Pauly 2006). Oproti tomu exprese dvou různých polypeptidů ve dvou replikonech odvozených z jednoho viru ve stejné buňce bývá nižší a často nedochází k sestavení funkčního multimeru vůbec (Verch et al. 1998).

Způsoby transientních modifikací jsou shrnuty v review od Gleba a spolupracovníků z roku 2007.

Systém	Výhody	Nevýhody
<b>Transgenní rostliny:</b> akumulace v rostlině	Vysoké výtěžky, snadné zvýšení produkce, ustanovené permanentní linie	Doba produkce, nejistoty ohledně regulace GMO
<b>Transgenní rostliny:</b> sekrece z kořenů či listů	Uzavřené pěstování, nízké riziko úniku do prostředí, purifikace	Omezená škála rostlin, nízké výtěžky, cena zařízení
<b>Transplastomické rostliny</b>	Vysoké výtěžky, mnohonásobná genová exprese, nízká toxicita proteinu pro rostlinu, omezení šíření transgenu do volné přírody	Absence glykosylace, některé případy horizontálního genového přenosu
<b>Virem infikované rostliny</b>	Vysoké výtěžky, krátká doba produkce, možnost více vektorů – směsná infekce	Nebezpečí úniku do prostředí, omezení velikosti konstruktů
<b>Agroinfiltrace</b>	Krátká doba produkce	Vysoká cena
<b>Buněčné a tkáňové kultury</b>	Krátká doba produkce, uzavřené pěstování, sekrece do média (purifikace), snadné dosažení souladu s právními předpisy	Vysoká cena

Tabulka 1.: Srovnání různých produkčních systémů založených na rostlinách (převzato a upraveno podle rev. Fischer et al. 2004)

## 6 Optimalizace rostlinných expresních systémů

Transformační rostlinné technologie jsou poměrně mladé (počátek 80. letech 20. století) a neustále se vyvíjí. Obecně výzkum směřuje k zesílení exprese, zvýšení stability proteinů cílením do buněčných kompartmentů a k vytvoření co nejbezpečnějších expresních systémů. Výťažky rekombinantních proteinů v transgenních rostlinách jsou sice již dnes konkurenceschopné s dalšími expresními systémy, ale stále existuje potenciál na jejich řádové zvýšení, čímž by se zjednodušila purifikace a zlepšila ekonomie jejich použití. Při řádovém zvýšení produkce a akumulace požadovaného proteinu v rostlinách by bylo možné výhodně produkovat biofarmaceutika v uzavřených sklenících.

Stupeň exprese transgenů se může zvyšovat použitím vhodných leader sekvencí, polyadenylačních signálů (Richter et al. 2000) a modifikacemi kodonů v transgenech tak, aby vyhovovaly rostlinným expresním systémům (rev. Streatfield et al. 2001). Nicméně na poli rostlinné exprese je ještě mnoho nejasného. V poslední době se stále častěji k řízení exprese transgenu využívají namísto silných konstitutivních promotorů (nejčastěji CaMV<sup>14</sup> 35S promotor) inducibilní regulovatelné promotory, které jsou po stimulaci vnějšími chemickými a fyzikálními podněty (UV záření, poranění) mnohem aktivnější (asi 30 x) (Kim et al. 2003). Dalším velmi slibným vývojem je použití promotorů specifických pro určité pletivo. Příkladem je promotor z fazolu (*Phaseolus vulgaris*) s expresí v semenech - ten byl u *Arabidopsis thaliana* použit pro produkci protilátek namísto klasického CaMV 35S promotoru a množství produkované protilátky v homozygotních semenech vzrostlo z 1 % na 36 % (De Jaeger et al. 2002). Dalšími příklady jsou promotory umožňující sekreci rekombinantních proteinů z kořenových vlásků pěstovaných v hydroponickém kultivačním médiu či sekreci do listové gutační tekutiny tabáku (Drake et al. 2003).

V případě cílené exprese proteinu do buněčných kompartmentů, jako je endoplazmatické retikulum (ER), či do apoplastu, dochází k akumulaci a nárůstu TSP v rostlině o několik jednotek procent (Ma 1995). ER poskytuje oxidativní prostředí, dostatek molekulárních chaperonů a naopak je zde málo proteáz, proto právě zde probíhá sbalování proteinů do nativního stavu, skládání do multimerních celků a post-translační modifikace. Po opatření proteinu signálním přívěskem (tag) KDEL, který jej zadržuje v ER, je jeho stupeň akumulace 2 – 10 x vyšší (rev. Schillberg, Fischer and Emans 2003). Při absenci cílové sekvence na transgenu je

---

<sup>14</sup> CaMV – cauliflower mosaic virus

protein sekretorickou dráhou dopravován do apoplastu. V závislosti na velikosti, může protein buď zůstat v apoplastu či být sekretován do média, což může být využito pro buněčné suspenze. Zde je ale stabilita proteinu o poznání menší než v ER. Cílení je též velmi důležité v případě toxicity proteinu pro hostitelskou rostlinu (Murray et al. 2002, shrnuto v Fischer et al. 2004).

Jak již bylo zmíněno výše, nejsou post-translační modifikace proteinů (glykosylace, fosforylace, aj.) rostlin úplně identické s živočišnými. To může vést ke špatnému sbalení proteinu či přímo k degradaci a následně nízkým výtěžkům. Rozdílná N-glykosylace rostlin nesyntetizuje některé živočišné cukry ( $\beta$ -1,4-galaktóza, kyselina sialová) a naopak přidává cukry pro rostliny specifické (xylóza,  $\alpha$ -1,3-fukóza), které mohou být pro člověka imunogenní (rev. Gleba et al. 2007). Rozdíly v glykosylaci u některých biofarmaceutik nejsou problémem (Vaquero et al. 1999), pokud ale ano, dá se přistoupit k použití transgenních rostlin s upraveným metabolismem poskytujícím cílenou glykosylaci proteinu. Tyto transgenní rostliny by se daly využít k bezpečné jak stabilní, tak přechodné produkci biofarmaceutik (Daskalova et al. 2010, Cox et al. 2006, Bakker et al. 2006). Alternativou na úkor ceny je samozřejmě chemická úprava po izolaci.

## **7 Které rostlinné druhy by byly potenciálně nejefektivnější?**

Neexistuje obecná shoda na tom, která rostlina či rostlinné pletivo by bylo pro průmyslovou produkci biofarmaceutik nejlepší. Při hledání ideálního expresního systému je kladen důraz hlavně na bezpečnost, biologickou aktivitu materiálu, a co nejnižší cenu. Další parametry jsou ale také velice důležité, jako jsou třeba výnosy, podmínky skladování, nutné investice pro vývoj a zavedení nových biofarmaceutik, množství nutného času a úsilí pro samotnou transformaci, strategie purifikace, geografický areál pro pěstování rostlin a blízkost místa zpracování a patenty jedinců a firem omezující konkurenční technologie (Stoger et al. 2002).

Mnoho rekombinantních proteinů bylo exprimováno v tabáku (rod *Nicotiana*). Tento model má mnoho výhod, ale i mnoho nevýhod. Tabák je lehce geneticky manipulovatelný a ve výzkumu je to již dobře zaběhnutý expresní model. Množství biomasy, schopnost množení a rychlost růstu je poměrně vysoká a produkuje obrovská množství semen. Produkt je extrahován z celé sklizené biomasy, převážně listů. Celý proces purifikace je obtížnější kvůli obsaženým toxickým alkaloidům, mezi které patří i nikotin (kultivary s nízkým obsahem nikotinu už jsou ale k dispozici).

Mezi další potenciálně využitelné transgenní rostliny, u kterých by byla produkce biofarmaceutik cílena do sklizené listové biomasy, patří například salát (*Lactuca sativa*) (Kapusta et al. 1999) nebo vojtěška (*Medicago sativa*) (Khouli et al. 1999). Vojtěška je pícnina produkující velká množství biomasy, navíc je to trvalá bylina se schopností fixace vzdušného dusíku díky symbiotickým bakteriím rodu *Rhizobium*. Není ji tedy nutno přihnojovat dusíkatými hnojivy. Zpracování a purifikace vojtěšky je však stejně jako u tabáku ztížena vysokým obsahem kyseliny šťavelové. U všech těchto rostlin, se zaměřením na listovou biomasu, je velkou nevýhodou vysoký podíl obsažené vody. Kvůli tomu je nutno rychlé zpracování okamžitě po sklizni. Navíc je zvýšena proteolýza proteinů během purifikace a následně i cena (shrnutí v Fischer et al. 2004).

Asi nejatraktivnější jsou rostliny exprimující transgen v semenech. Endosperm obsahuje mnoho TSP, přirozeně chrání proteiny před proteolytickou degradací, a ty tak mohou být dlouhodobě skladovány v chladu po dobu alespoň tří let bez ztráty aktivity (Larrick and Thomas 2001). Za pokojové teploty si proteiny v semenech uchovávají svou aktivitu různě dlouho podle druhu rostliny. Pro tento typ produkce biofarmaceutik je vhodné použít kulturní plodiny, u kterých existují elitní kultivary a vypracovaná agrotechnika. Mezi takové rostliny patří například pšenice (*Triticum*), ječmen (*Hordeum*), kukuřice (*Zea*) (Stoger et al. 2000), rýže (Torres et al. 1999), sója (*Glycine max*), řepka olejka (*Brassica napus*) a další, které již byly úspěšně transformovány.

Brambor (*Solanum tuberosum*) byl jako jeden z prvních využit k produkci rekombinantních protilátek. Navíc během 18 ti měsíců skladování hlíz v chladu dochází ke ztrátě aktivity u pouhých 50 % proteinů, což je výborný výsledek (Artsaenko et al. 1998). Brambory již byly vyzkoušeny pro produkci lidských protilátek (Schunmann, Coia and Waterhouse 2002), lidského sérového albuminu (Farran et al. 2002), TNF- $\alpha$  (Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ ) (Ohya et al. 2002) i pro produkci na VLP L1 založených vakcín proti HPV16 (Biemelt et al. 2003). Pokud ale brambory posoudíme z pohledu využití jako „jedlé vakcíny“, je zde nevýhoda nutnosti tepelné úpravy před konzumací. To by mohl být problém v případě rekombinantních proteinů, které za vysokého tepla ztrácí svojí biologickou aktivitu (Stoger et al. 2002, rev. Daniell et al. 2001b).

Mezi další rostliny, které byly transformovány k expresi transgenů patří rajčata (*Solanum lycopersicum*) (McGarvey et al. 1995), mrkev (*Daucus carota*), *Arabidopsis thaliana* a další. V poslední době se velmi vyvíjí metody transformace jednobuněčné zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii*, což je velmi výkonný systém pro chloroplastovou transformaci

(Mayfield, Franklin and Lerner 2003), vodní rostliny okřehku (*Lemna*) (Cox et al. 2006) a mechu *Physcomitrella patens*. Jistou dobu byla také prosazovaná myšlenka transformovat banány (*Musa*) kvůli jejich rozšíření téměř ve všech tropických oblastech světa, ve kterých jsou převážně chudé země sužované širokou škálou infekčních onemocnění. Vakcinace pomocí jedlých transgenních banánů podávaných v podobě pyré by tak mohla být pro tyto země určitým východiskem.

Druh rostliny	Výhody	Nevýhody
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Přístupnost mnoha mutantů, lehký pro transformaci, znalost genomové sekvence	Nízká produkce biomasy – nevhodný pro komerční využití.
<i>Physcomitrella patens</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> a <i>Lemna</i>	Klonální propagace, sekrece do média, snadná regulovatelnost, homologní rekombinace u <i>Physcomitrelly</i>	Obtížné zvyšování objemu produkce, cena
Tabák	Vysoká produkce biomasy, zaběhnuté transformační a expresní technologie, není potravina – GMO tedy potencionálně nekontaminuje potraviny, snadná rozšiřitelnost	Nízká stabilita proteinů ve sklizené biomase, přítomnost alkaloidů.
Vojtěška	Vysoká produkce biomasy, využití pro zvířecí vakcíny, klonální propagace, homogenní N-glykany	Nízká stabilita proteinů ve sklizené biomase, přítomnost kyseliny šťavelové.
Salát	Jedlý, využitelný pro lidské vakcíny.	Nízká stabilita proteinů ve sklizené biomase.
Kukuřice a rýže	Stabilita proteinů během skladování, vysoká produkce biomasy.	
Ječmen a pšenice	Stabilita proteinů během skladování	Nízký podíl rozpustného proteinu v semeni, obtížná transformace
Sója	Stabilita proteinů během skladování, Ekonomická, vysoká produkce biomasy	Obtížná transformace
Brambor a mrkev	Jedlé, stabilita proteinů během skladování	Nutnost tepelné úpravy u brambor
Rajčata	Jedlá, pěstování ve sklenících – zabránění úniku do prostředí.	Drahé pěstování, nutnost chlazení po sklizni
Řepka olejka a lnička setá ( <i>Camelina sativa</i> )	Systém fúze proteinu s oleosinem- snadná purifikace	Nízké výnosy, riziko úniku transgenu

Tabulka 2.: Výhody a nevýhody vybraných rostlinných druhů jako expresních systémů (převzato a upraveno podle rev. Fischer et al. 2004).

Nesmíme ale opomenout rostlinné buněčné kultury, které jsou výhodné zejména pro produkci malých molekul. Produkce proteinů pod naprostou kontrolou a snadnou regulovatelností tak může být velmi výhodnou variantou při schvalování celého procesu produkce v režimu GMP (Good manufacturing practice). V buněčných kulturách byla popsána produkce více než 20 farmaceutických proteinů, výtěžky jsou ale stále malé a optimalizace jsou nutné. Nejčastěji využívané jsou suspenze tabákových buněk (shrnutí v Fischer et al. 2004, Giddings et al. 2000).

## 8 Současný vývoj a budoucnost rostlinných expresních systémů

Použití rostlin se do budoucna jeví jako velmi slibné východisko pro produkci farmaceutik ve velkých množstvích. Na tomto poli působí nejenom mnoho akademických týmů základního výzkumu ale i řada firem, které usilují o komerční úspěch mnoha různých rekombinantních proteinů a vakcín. V současnosti se několik rekombinantních proteinů produkovaných v rostlinách již dostalo na trh, zatím ale pouze jako čisté standardy pro *in vitro* použití (například lidský sérový albumin z nabídky Sigma-Aldrich). Biotechnologické společnosti se většinou snaží vyvinout svou vlastní unikátní technologii založenou na určité metodě transformace a často tuto technologii rozvíjí jen na určitém rostlinném druhu. Firma Planet Biotechnology Inc.<sup>15</sup> zvolila GMO tabák jako výchozí platformu zejména pro produkci monoklonálních protilátek a dalších biofarmaceutik. Protilátky proti *Streptococcus mutans*, který způsobuje zubní kaz, jsou ve II. fázi klinických testů a protilátky proti původcům rýmy a nachlazení (Rhinovirům) jsou ve vývoji. Další firmou, která vyvíjí postupy produkce biofarmaceutik v tabáku je Meristem Therapeutics. Vojtěška byla zvolena kanadskou firmou Medicago Inc.<sup>16</sup>, okřehek společností Biolex Inc.<sup>17</sup>, *Physcomitrella patens* Greenovation Inc.<sup>18</sup>, rýže Ventrya BioScience<sup>19</sup> a na ječmen je zaměřena islandská firma ORF Genetics Ltd.<sup>20</sup>, která tak produkuje růstové faktory a cytokiny ve sklenicích vyhřívaných termálními prameny.

Společnost Icon Genetics<sup>21</sup> (Bayer AG) rozvíjí jak jadernou a plastidovou stabilní transformaci, tak i provirové transfekce. Metodou chloroplastové transformace si zvolila

---

<sup>15</sup> <http://www.planetbiotechnology.com>

<sup>16</sup> <http://www.medicago.com>

<sup>17</sup> <http://www.biolex.com>

<sup>18</sup> <http://www.greenovation.com>

<sup>19</sup> <http://www.ventria.com>

<sup>20</sup> <http://www.orfgenetics.com>

<sup>21</sup> <http://www.icongenetics.com>

firma Chlorogen. Pěstováním rostlin v hydroponickém kultivačním médiu a využití promotorů umožňujících sekreci proteinu z kořenových vlásků do média (Drake et al. 2003) se zabývá Phytomedics Inc.<sup>22</sup>. Olejiny, jako například řepka olejka (*Brassica napus*) nebo světlice (*Carthamus tinctorius*), poskytují možnost zjednodušení procesu izolace rekombinantních proteinů ze semen. Kanadská firma SemBioSys Genetics Inc.<sup>23</sup> vyvíjí postupy izolace na základě fúze proteinu s oleosinem. Fúzní protein tak může být snadno oddělen z olejových tělísek pomocí jednoduché extrakce a následně odštěpen od oleosinu endoproteázou. V současnosti využívá hlavně světlici, například k produkci inzulinu či hirudinu.

## 9 Závěr

Oblasti rostlinných expresních systémů se v současnosti bouřlivě rozvíjí a ještě není zdaleka jasné, jaký systém je nejvhodnější pro tu kterou aplikaci. Ale již dnes jsou první rostlinná rekombinantní farmaceutika v pokročilých fázích klinických testů a mnoho dalších je ve vývoji. Pokud dojde k masovému rozšíření této technologie, bude to mít velký význam zejména pro chudé oblasti světa. Jejím většímu použití však zatím brání mnoho různých faktorů jako například odpor veřejnosti ke GMO, nejasná legislativní úprava týkající se procesu výroby rekombinantních proteinů v rostlinách, vysoké počáteční investice a podobně. Následující roky ukáží, zda bude bouřlivý vývoj na tomto poli korunován úspěchem, tj. rekombinantními proteiny, které budou používány pro léčbu lidských pacientů.

---

<sup>22</sup> [http:// www.phytomedics.com](http://www.phytomedics.com)

<sup>23</sup> <http://www.sembisys.com>



## Použitá literatura

- Adams, M., L. Borysiewicz, A. Fiander, S. Man, B. Jasani, H. Navabi, C. Lipetz, A. S. Evans & M. Mason (2001) Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. *Vaccine*, 19, 2549-2556.
- Artsaenko, O., B. Kettig, U. Fiedler, U. Conrad & K. Düring (1998) Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Molecular Breeding*, 4, 313-319.
- Avesani, L., G. Marconi, F. Morandini, E. Albertini, M. Bruschetta, L. Bortesi, M. Pezzotti & A. Porceddu (2007) Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Research*, 16, 587-597.
- Bakker, H., G. J. A. Rouwendal, A. S. Karnoup, D. E. A. Florack, G. M. Stoopen, J. Helsper, R. Van Ree, I. Van Die & D. Bosch (2006) An antibody produced in tobacco expressing a hybrid beta-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7577-7582.
- Biemelt, S., U. Sonnewald, P. Gaimbacher, L. Willmitzer & M. Müller (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *Journal of Virology*, 77, 9211-9220.
- Boulet, G., C. Horvath, D. V. Broeck, S. Sahebali & J. Bogers (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 2006-2011.
- Boynton, J. E., N. W. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randolphanderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark & J. C. Sanford (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high-velocity microprojectiles. *Science*, 240, 1534-1538.
- Carter, J. J., L. A. Koutsy, J. P. Hughes, S. K. Lee, J. Kuypers, N. Kiviat & D. A. Galloway (2000) Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *Journal of Infectious Diseases*, 181, 1911-1919.
- Chen, X. J. S., G. Casini, S. C. Harrison & R. L. Garcea (2001) Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: Purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *Journal of Molecular Biology*, 307, 173-182.
- Conrad, U., U. Fiedler, O. Artsaenko & J. Phillips (1998) High-level and stable accumulation of single-chain Fv antibodies in plant storage organs. *Journal of Plant Physiology*, 152, 708-711.
- Cox, K. M., J. D. Sterling, J. T. Regan, J. R. Gasdaska, K. K. Frantz, C. G. Peele, A. Black, D. Passmore, C. Moldovan-Loomis, M. Srinivasan, S. Cuisson, P. M. Cardarelli & L. F. Dickey (2006) Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature Biotechnology*, 24, 1591-1597.
- Culp, T. D. & N. D. Christensen (2004) Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology*, 319, 152-161.
- Cutts, F. T., S. Franceschi, S. Goldie, X. Castellsague, S. de Sanjose, G. Garnett, W. J. Edmunds, P. Claeys, K. L. Goldenthal, D. M. Harper & L. Markowitz (2007) Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bulletin of the World Health Organization*, 85, 719-726.
- Daniell, H., R. Datta, S. Varma, S. Gray & S. B. Lee (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology*, 16, 345-348.
- Daniell, H., M. S. Khan & L. Allison (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science*, 7, 84-91.
- Daniell, H., B. Muthukumar & S. B. Lee (2001a) Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Current Genetics*, 39, 109-116.
- Daniell, H., S. J. Streatfield & K. Wycoff (2001b) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6, 219-226.
- Daniell, H., J. Vivekananda, B. L. Nielsen, G. N. Ye, K. K. Tewari & J. C. Sanford (1990) Transient foreign gene-expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 88-92.

- Daskalova, S. M., J. E. Radder, Z. A. Cichacz, S. H. Olsen, G. Tsaprailis, H. Mason & L. C. Lopez (2010) Engineering of *N. benthamiana* L. plants for production of N-acetylgalactosamine-glycosylated proteins - towards development of a plant-based platform for production of protein therapeutics with mucin type O-glycosylation. *Bmc Biotechnology*, 10.
- De Cosa, B., W. Moar, S. B. Lee, M. Miller & H. Daniell (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology*, 19, 71-74.
- De Jaeger, G., S. Scheffer, A. Jacobs, M. Zambre, O. Zobell, A. Goossens, A. Depicker & G. Angenon (2002) Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nature Biotechnology*, 20, 1265-1268.
- Dohi, K., M. Nishikiori, A. Tamai, M. Ishikawa, T. Meshi & M. Mori (2006) Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. *Archives of Virology*, 151, 1075-1084.
- Doorbar, J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110, 525-541.
- Drake, P. M. W., D. M. Chargelegue, N. D. Vine, C. J. van Dolleweerd, P. Obregon & J. K. C. Ma (2003) Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Molecular Biology*, 52, 233-241.
- Dufourmantel, N., B. Pelissier, F. Garcon, G. Peltier, J. M. Ferullo & G. Tissot (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Molecular Biology*, 55, 479-489.
- Everett, R. D. (2001) DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene*, 20, 7266-7273.
- Farran, I., J. J. Sanchez-Serrano, J. F. Medina, J. Prieto & A. M. Mingo-Castel (2002) Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. *Transgenic Research*, 11, 337-346.
- Fausch, S. C., D. M. Da Silva & W. M. Kast (2003) Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. *Cancer Research*, 63, 3478-3482.
- Fehrmann, F. & L. A. Laimins (2003) Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 22, 5201-5207.
- Fischer, R., E. Stoger, S. Schillberg, P. Christou & R. M. Twyman (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 152-158.
- Fitchen, J., R. N. Beachy & M. B. Hein (1995) Plant-virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine*, 13, 1051-1057.
- Florin, L., K. A. Becker, C. Lambert, T. Nowak, C. Sapp, D. Strand, R. E. Streeck & M. Sapp (2006) Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2. *Journal of Virology*, 80, 6691-6696.
- Gerard, C. M., N. Baudson, K. Kraemer, C. Bruck, N. Garcon, Y. Paterson, Z. K. Pan & D. Pardoll (2001) Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations on tumour growth. *Vaccine*, 19, 2583-2589.
- Gerber, S., C. Lane, D. M. Brown, E. Lord, M. Dilenzo, J. D. Clements, E. Rybicki, A. L. Williamson & R. C. Rose (2001) Human papillomavirus virus-like particles are efficient oral immunogens when coadministered with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin mutant R192G or CpG DNA. *Journal of Virology*, 75, 4752-4760.
- Giddings, G., G. Allison, D. Brooks & A. Carter (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, 18, 1151-1155.
- Giritch, A., S. Marillonnet, C. Engler, G. van Eldik, J. Botterman, V. Klimyuk & Y. Gleba (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 14701-14706.
- Giroglou, T., L. Florin, F. Schafer, R. E. Streeck & M. Sapp (2001) Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*, 75, 1565-1570.
- Gleba, Y., V. Klimyuk & S. Marillonnet (2005) Magnification - a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 23, 2042-2048.
- (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 134-141.

- He, Z., A. P. Wlazole, D. W. Kowalczyk, J. Cheng, Z. Q. Xiang, W. Giles-Davis & H. C. J. Ertl (2000) Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. *Virology*, 270, 146-161.
- Hiatt, A., R. Cafferkey & K. Bowdish (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342, 76-78.
- Hiatt, A. & M. Pauly (2006) Monoclonal antibodies from plants: A new speed record. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 14645-14646.
- Hobbs, S. L. A., T. D. Warkentin & C. M. O. Delong (1993) Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Molecular Biology*, 21, 17-26.
- Hood, E. E., S. L. Woodard & M. E. Horn (2002) Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants - myths and realities. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 630-635.
- Hou, B. K., Y. H. Zhou, L. H. Wan, Z. L. Zhang, G. F. Shen, Z. H. Chen & Z. M. Hu (2003) Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Research*, 12, 111-114.
- Hung, C. F., A. Monie, R. D. Alvarez & T. C. Wu (2007) DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. *Experimental and Molecular Medicine*, 39, 679-689.
- Kamper, N., P. M. Day, T. Nowak, H. C. Selinka, L. Florin, J. Bolscher, L. Hilbig, J. T. Schiller & M. Sapp (2006) A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *Journal of Virology*, 80, 759-768.
- Kapusta, J., A. Modelska, M. Figlerowicz, T. Pniewski, M. Letellier, O. Lisowa, V. Yusibov, H. Koprowski, A. Plucienniczak & A. B. Legocki (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *Faseb Journal*, 13, 1796-1799.
- Khoudi, H., S. Laberge, J. M. Ferullo, R. Bazin, A. Darveau, Y. Castonguay, G. Allard, R. Lemieux & L. P. Vezina (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 64, 135-143.
- Kim, J. M. & S. P. Mayfield (1997) Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science*, 278, 1954-1957.
- Kim, K. Y., S. Y. Kwon, H. S. Lee, Y. Hur, J. W. Bang & S. S. Kwak (2003) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Molecular Biology*, 51, 831-838.
- Kines, R. C., C. D. Thompson, D. R. Lowy, J. T. Schiller & P. M. Day (2009) The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 20458-20463.
- Komarova, T. V., M. V. Skulachev, A. S. Zvereva, A. M. Schwartz, Y. L. Dorokhov & J. G. Atabekov (2006) New viral vector for efficient production of target proteins in plants. *Biochemistry-Moscow*, 71, 846-850.
- Koprowski, H. & V. Yusibov (2001) The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine*, 19, 2735-2741.
- Kumar, S., A. Dhingra & H. Daniell (2004a) Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiology*, 136, 2843-2854.
- (2004b) Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Molecular Biology*, 56, 203-216.
- Lai, W. B. & A. P. J. Middelberg (2002) The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from Escherichia coli inclusion bodies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25, 121-128.
- Larrick, J. W. & D. W. Thomas (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 411-418.
- Lee, S. M., K. S. Kang, H. Chung, S. H. Yoo, X. M. Xu, S. B. Lee, J. J. Cheong, H. Daniell & M. Kim (2006) Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Molecules and Cells*, 21, 401-410.
- Lelivelt, C. L. C., M. S. McCabe, C. A. Newell, C. B. deSnoo, K. M. P. van Dun, I. Birch-Machin, J. C. Gray, K. H. G. Mills & J. M. Nugent (2005) Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 58, 763-774.
- Ma, J. K. C. 1995. Antibody expression in plants. In *Antibody Expression and Engineering*, eds. H. Y. Wang & T. Imanaka, 56-69.

- Maenpaa, P., E. B. Gonzalez, S. Ahlandsberg & C. Jansson (1999) Transformation of nuclear and plastomic plant genomes by biolistic particle bombardment. *Molecular Biotechnology*, 13, 67-72.
- Magnusson, P. K. E., P. Sparen & U. B. Gyllensten (1999) Genetic link to cervical tumours. *Nature*, 400, 29-30.
- Marillonnet, S., C. Thoeringer, R. Kandzia, V. Klimyuk & Y. Gleba (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology*, 23, 718-723.
- Massa, S., R. Franconi, R. Brandi, A. Muller, V. Mett, V. Yusibov & A. Venuti (2007) Anti-cancer activity of plant-produced HPV16 E7 vaccine. *Vaccine*, 25, 3018-3021.
- Mayfield, S. P., S. E. Franklin & R. A. Lerner (2003) Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 438-442.
- McCormick, A. A., T. A. Corbo, S. Wykoff-Clary, K. E. Palmer & G. P. Pogue (2006) Chemical conjugate TMV - Peptide bivalent fusion vaccines improve cellular immunity and tumor protection. *Bioconjugate Chemistry*, 17, 1330-1338.
- McCormick, A. A., S. J. Reinl, T. I. Cameron, F. Vojdani, M. Fronefield, R. Levy & D. Tuse (2003) Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig. *Journal of Immunological Methods*, 278, 95-104.
- McGarvey, P. B., J. Hammond, M. M. Dienelt, D. C. Hooper, Z. F. Fu, B. Dietzschold, H. Koprowski & F. H. Michaels (1995) Expression of rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Bio-Technology*, 13, 1484-1487.
- Mouková, L., R. Feranec & J. Chovanec (2010) Vakcinace proti lidskému papillomaviru v ČR. *Klinická onkologie*, 23(2), 125-126.
- Murray, C., P. W. Sutherland, M. M. Phung, M. T. Lester, R. K. Marshall & J. T. Christeller (2002) Expression of biotin-binding proteins, avidin and streptavidin, in plant tissues using plant vacuolar targeting sequences. *Transgenic Research*, 11, 199-214.
- Nardelli-Haeffliger, D., D. Wirthner, J. T. Schiller, D. R. Lowy, A. Hildesheim, F. Ponci & P. De Grandi (2003) Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women vaccinated with human papillomavirus 16 virus-like particles. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 1128-1137.
- Neutra, M. R., E. Pringault & J. P. Kraehenbuhl (1996) Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual Review of Immunology*, 14, 275-300.
- Ohya, K., N. Itchoda, K. Ohashi, M. Onuma, C. Sugimoto & T. Matsumura (2002) Expression of biologically active human tumor necrosis factor- $\alpha$  in transgenic potato plant. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22, 371-378.
- Palmer, K. E., A. Benko, S. A. Doucette, T. I. Cameron, T. Foster, K. M. Hanley, A. A. McCormick, M. McCulloch, G. P. Pogue, M. L. Smith & N. D. Christensen (2006) Protection of rabbits against cutaneous papillomavirus infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes. *Vaccine*, 24, 5516-5525.
- Pastrana, D. V., R. Gambhira, C. B. Buck, Y. Y. S. Pang, C. D. Thompson, T. D. Culp, N. D. Christensen, D. R. Lowy, J. T. Schiller & R. B. S. Roden (2005) Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology*, 337, 365-372.
- Petry, K. U., D. Scheffel, U. Bode, T. Gabrysiak, H. Kochel, E. Kupsch, M. Glaubitz, S. Niesert, H. Kuhnle & I. Schedel (1994) Cellular immunodeficiency enhances the progression of Human papillomavirus-associated cervical lesions. *International Journal of Cancer*, 57, 836-840.
- Puchta, H. (2000) Removing selectable marker genes: Taking the shortcut. *Trends in Plant Science*, 5, 273-274.
- Richards, R. M., D. R. Lowy, J. T. Schiller & P. M. Day (2006) Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1522-1527.
- Richter, L. J., Y. Thanavala, C. J. Arntzen & H. S. Mason (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology*, 18, 1167-1171.

- Rose, R. C., C. Lane, S. Wilson, J. A. Suzich, E. Rybicki & A. L. Williamson (1999) Oral vaccination of mice with human papillomavirus virus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies. *Vaccine*, 17, 2129-2135.
- Ruf, S., M. Hermann, I. J. Berger, H. Carrer & R. Bock (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology*, 19, 870-875.
- Sankaranarayanan, R. & J. Ferlay (2006) Worldwide burden of gynaecological cancer: The size of the problem. *Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 20, 207-225.
- Schillberg, S., R. Fischer & N. Emans (2003) 'Molecular farming' of antibodies in plants. *Naturwissenschaften*, 90, 145-155.
- Schiller, J. T., P. M. Day & R. C. Kines (2010) Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*, 118, S12-7.
- Schiller, J. T. & D. R. Lowy (2006) Prospects for cervical cancer prevention by human papillomavirus vaccination. *Cancer Res*, 66, 10229-32.
- Schiller, J. T. & D. Nardelli-Haeffliger (2006) Second generation HPV vaccines to prevent cervical cancer. *Vaccine*, 24, 147-153.
- Schunmann, P. H. D., G. Coia & P. M. Waterhouse (2002) Biopharming the SimpliRED (TM) HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco. *Molecular Breeding*, 9, 113-121.
- Sidorov, V. A., D. Kasten, S. Z. Pang, P. T. J. Hajdukiewicz, J. M. Staub & N. S. Nehra (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant Journal*, 19, 209-216.
- Sikdar, S. R., G. Serino, S. Chaudhuri & P. Maliga (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 18, 20-24.
- Skarjinskaia, M., Z. Svab & P. Maliga (2003) Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicaceae. *Transgenic Research*, 12, 115-122.
- Smith, M. L., J. A. Lindbo, S. Dillard-Telm, P. M. Brosio, A. B. Lasnik, A. A. McCormick, L. V. Nguyen & K. E. Palmer (2006) Modified Tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology*, 348, 475-488.
- Spataro, V., C. Norbury & A. L. Harris (1998) The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *British Journal of Cancer*, 77, 448-455.
- Stanley, M., L. Gissmann & D. Nardelli-Haeffliger (2008) Immunobiology of Human Papillomavirus Infection and Vaccination - Implications for Second Generation Vaccines. *Vaccine*, 26, K62-K67.
- Stoger, E., M. Sack, Y. Perrin, C. Vaquero, E. Torres, R. M. Twyman, P. Christou & R. Fischer (2002) Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding*, 9, 149-158.
- Stoger, E., C. Vaquero, E. Torres, M. Sack, L. Nicholson, J. Drossard, S. Williams, D. Keen, Y. Perrin, P. Christou & R. Fischer (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology*, 42, 583-590.
- Streatfield, S. J., J. M. Jilka, E. E. Hood, D. D. Turner, M. R. Bailey, J. M. Mayor, S. L. Woodard, K. K. Beifuss, M. E. Horn, D. E. Delaney, I. R. Tizard & J. A. Howard (2001) Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*, 19, 2742-2748.
- Streeck, R. E. (2002) A short introduction to papillomavirus biology. *Intervirology*, 45, 287-289.
- Svab, Z., P. Hajdukiewicz & P. Maliga (1990) Stable transformation of plastids in higher-plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 8526-8530.
- Svab, Z. & P. Maliga (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for chimeric AADA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 913-917.
- Torres, E., C. Vaquero, L. Nicholson, M. Sack, E. Stoger, J. Drossard, P. Christou, R. Fischer & Y. Perrin (1999) Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. *Transgenic Research*, 8, 441-449.
- Usha, R., J. B. Rohll, V. E. Spall, M. Shanks, A. J. Maule, J. E. Johnson & G. P. Lomonossoff (1993) Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology*, 197, 366-374.

- Vaccarella, S., S. Franceschi, R. Herrero, N. Munioz, P. J. F. Snijders, G. M. Clifford, J. S. Smith, E. Lazcano-Ponce, S. Sukvirach, H. R. Shin, S. de Sanjose, M. Molano, E. Matos, C. Ferreccio, P. T. H. Anh, J. O. Thomas, C. Meijer & I. H. P. S. Study (2006) Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: Pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15, 326-333.
- Vaquero, C., M. Sack, J. Chandler, J. Drossard, F. Schuster, M. Monecke, S. Schillberg & R. Fischer (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 11128-11133.
- Vaquero, C., M. Sack, F. Schuster, R. Finnern, J. Drossard, D. Schumann, A. Reimann & R. Fischer (2002) A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. *Faseb Journal*, 16, 408-+.
- Varsani, A., A. L. Williamson, D. Stewart & E. P. Rybicki (2006) Transient expression of Human papillomavirus type 16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* using an infectious tobamovirus vector. *Virus Research*, 120, 91-96.
- Vaucheret, H., C. Beclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J. B. Morel, P. Mourrain, J. C. Palauqui & S. Vernhettes (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant Journal*, 16, 651-659.
- Verch, T., V. Yusibov & H. Koprowski (1998) Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *Journal of Immunological Methods*, 220, 69-75.
- Villa, L. L., K. A. Ault, A. R. Giuliano, R. L. R. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, D. R. Brown, A. Ferenczy, D. M. Harper, L. A. Koutsky, R. J. Kurman, M. Lehtinen, C. Malm, S. E. Olsson, B. M. Ronnett, F. E. Skjeldestad, M. Steinwall, M. H. Stoler, C. M. Wheeler, F. J. Taddeo, J. Yu, L. Lupinacci, R. Railkar, R. Marchese, M. T. Esser, J. Bryan, K. U. Jansen, H. L. Sings, G. M. Tamms, A. J. Saah & E. Barr (2006) Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine*, 24, 5571-5583.
- Voinnet, O., S. Rivas, P. Mestre & D. Baulcombe (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal*, 33, 949-956.
- Waheed, M. T., N. Thones, M. Muller, S. W. Hassan, N. M. Razavi, E. Lossel, H. P. Kaul & A. G. Lossel (2011) Transplastomic expression of a modified human papillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: a step towards cost-effective second-generation vaccines. *Transgenic Research*, 20, 271-282.
- Werner, S., S. Marillonnet, G. Hause, V. Klimyuk & Y. Gleba (2006) Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 17678-17683.
- Woodman, C. B. J., S. I. Collins & L. S. Young (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7, 11-22.
- Yusibov, V., A. Modelska, K. Stepkowski, M. Agadjanyan, D. Weiner, D. C. Hooper & H. Koprowski (1997) Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5784-5788.
- Zupan, J., T. R. Muth, O. Draper & P. Zambryski (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal*, 23, 11-28.
- zur Hausen, H. (2002) Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2, 342-350.